

Université de Montréal

**L'étude du rôle de l'interleukine 6 dans le métabolisme lipidique de la cardiomyopathie
diabétique**

par

Yahi Ourdia

Institut de cardiologie de Montréal

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures et post-doctorales

en vue de l'obtention du grade de Maître es (M. Sc.)

en sciences biomédicales

option Médecine expérimentale

Mars 2018

© Ourdia Yah, 2018

Université de Montreal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé:

**L'étude du rôle de l'interleukine 6 dans le métabolisme lipidique de la cardiomyopathie
diabétique**

Présenté par:

Ourdia Yahia

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Eric Thorin, Ph. D., président-rapporteur

Nicolas Bousette, Ph. D., directeur de recherche

Stéphanie Fulton, Ph. D., membre du jury

Résumé:

La cardiomyopathie diabétique est associée à une accumulation des lipides au niveau du muscle cardiaque. Afin de comprendre l'effet de la lipotoxicité on a voulu savoir quelles sont les voies de signalisation du métabolisme lipidique qui sont perturbées dans les maladies cardiaques. Nous avons précédemment montré que le palmitate, un acide gras saturé toxique, induit fortement l'expression de l'IL-6 dans les cardiomyocytes primaires. Par contre, le co-traitement de ces cellules avec de l'oléate, un acide gras mono-insaturé non-toxique cause une diminution de l'expression de IL-6 et de la toxicité due au palmitate. Ceci suggère que la lipotoxicité du palmitate pourrait être due à l'IL-6. Pour confirmer cela, nous avons testé l'effet de l'IL-6 knockdown (KD) de façon préliminaire, utilisant deux différents siARNs ciblant différentes séquences du gène IL-6. Nous avons constaté que la diminution du taux d'IL-6 avec les siARNs n'a pas atténué la mort cellulaire induite par le palmitate, mais au contraire l'a accentuée. Dans les cellules traitées avec l'oléate qui est normalement non toxique, le KD de l'IL-6 a provoqué une mort cellulaire.

Ces résultats nous ont mené aux travaux de cette maîtrise qui avait pour but d'évaluer comment l'IL-6 pouvait affecter le métabolisme lipidique. Tout d'abord, nous avons mesuré le taux d'IL-6 sécrété par les cardiomyocytes primaires suite aux traitements avec l'oléate et le palmitate. Ensuite nous avons évalué l'effet de l'IL-6 recombinante sur les cardiomyoblastes H9C2, d'une part sur la viabilité et d'une autre part sur la lipotoxicité en utilisant la chromatographie sur couche mince. Nos résultats préliminaires supportent l'idée que l'IL-6 serait nécessaire pour le métabolisme lipidique et aurait un effet cardioprotecteur à une certaine dose. Ainsi, elle protégerait les cardiomyocytes contre la lipotoxicité et cela en favorisant la β -oxydation (dégradation des acides gras) au niveau des mitochondries. Il reste à valider les travaux sur un modèle animal. L'ensemble des résultats constituent une ébauche pour comprendre le rôle que pourrait jouer l'IL-6 dans le métabolisme lipidique de la cardiomyopathie diabétique.

Mots clés: IL-6, cytokine, inflammation, cardiomyopathie diabétique et lipotoxicité.

Abstract:

Diabetic cardiomyopathy is associated with an accumulation of lipids in the heart muscle and to understand the effect of lipotoxicity, we wanted to know what are the signaling pathways of lipid metabolism that are disrupted in heart disease. We have previously shown that palmitate, a toxic saturated fatty acid, induces IL-6 in primary cardiomyocytes. In contrast, co-treatment of these cells with oleate, a non-toxic monounsaturated fatty acid, promotes a decrease in IL-6 expression and palmitate toxicity. This suggests that the lipotoxicity of palmitate may be caused by the IL-6. To confirm this, we tested the effect of IL-6 knockdown (KD), using two different siRNAs targeting the sequences of the IL-6 gene. Interestingly, the decrease of IL-6 with siRNAs did not attenuate the palmitate-induced cell death, but on the contrary accentuated it. In addition, the KD of IL-6 in cells treated with oleate, which is normally nontoxic, caused cell death.

This last finding had led to the work of this master. Our objective was to evaluate the effect of IL-6 on lipid metabolism. Firstly, we measured the level of exogenous IL-6 secreted by primary cardiomyocytes treated with oleate or palmitate. Then, we tested the effect of IL6-Recombinant in cardiomyocytes, using the cardiomyoblasts H9C2, on viability and on lipotoxicity using thin layer chromatography. Our preliminary results support that IL-6 could be necessary for lipid metabolism, with a cardioprotective effect at a certain dose by protecting cardiomyocytes against lipotoxicity by promoting β -oxydation (degradation of fatty acids) in the mitochondria. This results should be validated using an animal model. All of our results is a rough sketch to understand the role that IL-6 could play in the lipid metabolism of diabetic cardiomyopathy.

Keywords: IL-6, cytokine, inflammation, diabetic cardiomyopathy and lipotoxicity.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	v
Liste des abréviations.....	vi
Remerciements.....	viii
I. INTRODUCTION.....	1
1. Diabète type 2.....	1
1.1. Définition.....	1
1.2. Prévalence.....	2
2. Cardiomyopathie diabétique.....	4
2.1. Définition.....	4
2.2. Métabolisme cardiaque.....	4
2.2.1. La voie du glucose vs la voie des acides gras et β -oxydation.....	4
2.2.2. Impact du DT2 sur les ces deux voies métaboliques.....	5
3. L'inflammation.....	9
3.1. Mécanisme de l'inflammation associé à la lipotoxicité et les acteurs impliqués.....	9
3.2. IL-6 et les voies de signalisation.....	10
3.3. L'IL-6 dans le DT2.....	13
3.4. L'IL-6 dans la cardiomyopathie diabétique.....	14
II. PRÉALABLES, JUSTIFICATION ET OBJECTIFS DU SUJET.....	17
2.1. Préalables et justification.....	17
2.2. Objectifs.....	19
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	20
3.1. Préparation des acides gras.....	20
3.2. Isolation et culture des cardiomyocytes primaires.....	20
3.3. Culture cellulaire des H9C2.....	21

3.4. IL-6 recombinante.....	21
3.5. Test de viabilité.....	22
3.6. La méthode immuno-enzymatique Elisa de l'IL-6.....	22
3.7. Isolation des lipides par la méthode Bligh et Dyer.....	22
3.8. Chromatographie sur couche mince.....	23
3.9. Analyse statistique.....	23
IV. RÉSULTATS.....	24
4.1. Mesure du taux d'IL-6 sécrétée par les cardiomyocytes primaires.....	24
4.2. L'effet de l'addition de l'IL-6 recombinante sur la viabilité des cardiomyocytes H9C2.....	25
4.3. L'effet de l'addition de l'IL-6 recombinante sur la lipotoxicité des cardiomyocytes H9C2.....	26
V. DISCUSSION.....	28
VI. CONCLUSION.....	32
Bibliographie.....	33
Annexes.....	i
Résultats supplémentaires.....	v
Autorisations.....	vi

LISTE DES FIGURES

Figure 1: La prévalence du diabète dans le monde entre l'année 1980 et 2014.....	3
Figure 2: Métabolisme du glucose et des acides gras chez un coeur sain.....	5
Figure 3: Le métabolisme du glucose lors de l'initiation et la progression de la cardiomyopathie diabétique.....	6
Figure 4: Le métabolisme des acides gras et l'implication des PPARs.....	8
Figure 5: Effet de la lipotoxicité lors du processus inflammatoire.....	10
Figure 6: Les différentes voies de signalisation qui sont impliquées dans le mécanisme inflammatoire de l'IL-6.....	11
Figure 7: La signalisation classique et la signalisation Trans de l'IL-6.....	13
Figure 8: Le passage de l'IL-6 de la forme protectrice vers la forme pathogène au niveau des cardiomyocytes.....	15
Figure 9: L'effet de l'extinction du gène de l'IL-6 sur la viabilité des cardiomyocytes.....	19
Figure 10: Le taux d'IL-6 sécrétée par les cardiomyocytes primaires lors de la lipotoxicité.....	24
Figure 11: L'IL-6 diminue le taux de mortalité dans les cardiomyocytes H9C2.....	25
Figure 12: L'IL-6 semble diminuer le taux des triglycérides dans les cardiomyocytes H9C2....	27

ABRÉVIATIONS

PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes
AG	Acide gras
TAG	Triacylglycérol
DAG	Diacylglycérol
MAG	Monoacylglycérol
IL-6	Interleukine 6
β-oxydation	Bêta-oxydation
DT 2	Diabète type 2
MCV	Maladies cardiovasculaires
OMS	Organisation mondiale de la santé
q-PCR	Quantitative Polymerase chain reaction
CCM	Chromatographie sur couche mince
BSA	Albumine de sérum bovin
SVF	Sérum de veau foetal
Cpt1b	Carnitine palmitoyl transférase
AcadI	Acyl-CoA dehydrogenase
AcsI	Acyl-CoA Synthase
TNFα	Tumor necrosis factor (facteur de nécrose tumorale)
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide
AMPK	AMP-activated protéine kinase
R-IL6	Récepteur à l'IL-6
gp 130	Glycoprotéine 130
sR-IL6	Récepteur soluble à l'IL-6
sgp130	Glycoprotéine 130 soluble
TLR2	Récepteur type Toll 2
TLR4	Récepteur type Toll 4
HEK-293	Human Embryonic Kidney 293
Scram	Scramble
NFκB	Facteur nucléaire Kappa B
SOCS 3	supresseur de la signalisation des cytokines 3
STAT	signal transducteur et activateur de la transcription
JAK	Janus Kinase
mPGES	Microsomal Prostaglandine E synthase
CMLh	Cellules musculaires lisses humaines
ATP	Adénosine triphosphate
PDH	Pyruvate déshydrogénase
ROS	Espèce réactive d'exogène
O-N-GlnNAc	O-N-acétylglycosaminylation

Ca²⁺	Calcium
TFs	Facteurs de transcription nucléaires
H	Histone
ANT	Adénine nucléotide translocase
ANP	Peptide natriurétique auriculaire
BNP	Peptide cérébral natriurétique

REMERCIEMENTS

Je dédie ce travail aux personnes qui me sont chères et aux champs d'oliviers (Thizemrîn ouzemour). Particulièrement à ceux de la KABYLIE en ALGÉRIE, ainsi qu'à ceux présents dans toute la Méditerranée.

Pour nos vies ayant toujours tournées autour d'eux.

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. *Nicolas BOUSETTE* de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ce fut un réel plaisir d'être sous sa supervision. Tout au long de ma présence au sein de son équipe, il a toujours été là pour me guider dans mes travaux de recherche. Son sujet, m'a tout de suite enchanté lorsqu'il m'a été exposé. Je le remercie infiniment pour m'avoir donné la possibilité d'intégrer son équipe de recherche.

Je remercie infiniment les membres de mon jury:

Le Dr. *Eric THORIN*. Son acceptation pour être dans mon membre du jury m'a fait un grand honneur. Je lui suis très reconnaissante pour tout le temps qu'il a su mettre dans son rôle important pour mon comité de parrainage. Également, je lui vaut toute ma gratitude pour toutes les fois où il me demandait, comment est-ce que mes travaux avançaient dans les couloirs de l'ICM.

La Dre. *Stéphanie FULTON*. Elle est une chercheuse que j'admire beaucoup, car le peu de temps qu'en a pu passer ensemble lors de mon comité de thèse, sa gentillesse et sa finesse m'ont tout de suite interpellées. Ainsi, je tiens à lui dire que je suis ravie de l'avoir en tant qu'un membre dans mon jury.

La Dre. *Catherine MARTEL*. Elle a toujours été là lorsque j'avais besoin de parler avec elle. Elle était toujours soucieuse de savoir comment avançait mon travail dans le laboratoire. Nos discussions me faisaient énormément plaisir à chaque rencontre. Un grand merci à son oreille

très attentive. Sans oublier sa présence dans mon comité de parrainage dans lequel son opinion fut toujours pertinente et enrichissante.

Je remercie aussi mes collègues de laboratoire que j'ai pu côtoyer pendant ma présence avec eux: Le premier étant *Taha HAF FAR*, qui a toujours su être à mon écoute et qui m'a beaucoup aidé dans certaines tâches, tel que sa volonté de jouer le rôle d'un portefaix pour les grandes bouteilles d'eau distillée entre les étages de l'institut de cardiologie de Montréal. Un jour, mes os te seront bien reconnaissants!

Le deuxième est *Ali AKOUMI* qui a su apporter une grande convivialité lorsqu'il a rejoint notre équipe. Une agréable compagnie qui a toujours été là pour nous. Merci infiniment de te désigner à chaque fois pour acheter mes sandwiches du midi.

En somme, les garçons, vous étiez de magnifiques collègues avec lesquels j'ai beaucoup apprécié travailler. J'espère que c'est réciproque!

Et en troisième, je tiens à remercier à son tour Felix Brebué-Simard avec lequel je n'ai passé qu'environ 3 semaines, mais qui en ce petit temps a su me transmettre beaucoup de connaissance m'ayant aidé à débiter mon projet. Ces travaux ayant amorcé mon sujet de recherche.

J'espère que ce travail, apportera une petite pierre dans le domaine de la recherche ayant été étudié. J'avoue que le travail reste extrêmement timide, cela dit le potentiel est présent. C'est une avenue qui sera très intéressante à investiguer dans des recherches futures dans le domaine de cardiomyopathie diabétique, lipotoxicité cardiaque et la cardio-inflammation.

Enfin, je remercie toute ma famille que je n'ai pas vu depuis quelques années, de m'avoir soutenu dans mon long processus d'études sur les trois continents. Surtout Vava: *Boussad YAH*, Yema: *Fatima-Ghenima SAHLI* et Argaziw: *Youssef SMALINI (Youyou)*. Ils ont toujours été là pour moi dans les moments difficiles que j'ai pu traverser tout au long de mon parcours. Leurs sourires et leurs encouragements étaient pour moi un trésor inestimable et un puit inépuisable de courage. Vous me manquez terriblement et je vous aime profondément.

I. INTRODUCTION:

1. DIABÈTE TYPE 2 :

1.1. Définition:

Le diabète type 2 (DT 2) est considéré comme étant le plus fréquent diabète comparé au diabète type 1. Il est caractérisé par une hyperglycémie engendrée par une résistance du corps à l'insuline circulante qui est une hormone produite par les îlots de Langerhans au niveau des cellules bêta (cellules β) du pancréas (**Laaksu et Kuusisto, 2014**). Le diagnostic pour un DT2 est d'avoir un taux de glycémie à jeun $\geq 7,0$ mmol/L (1,26 g/L) (**Rapport mondial sur le diabète, OMS, 2016**). Il a été rapporté que l'obésité était un facteur prépondérant dans l'apparition du diabète type 2 où l'augmentation du tissu adipeux chez les sujets obèses permet l'augmentation des acides gras libres, d'hormones, de cytokines pro-inflammatoires et d'autres facteurs jouant un rôle dans la résistance à l'insuline (**Palomer et al, 2017**). Elle a plusieurs causes: le mode de nutrition, l'activité physique, les facteurs socio-économiques, l'environnement, l'hérédité, le métabolisme et le microbiome qui sont propres à chaque individu (**Chandler et al, 2017**). D'autres auteurs ont rapporté que plusieurs organes jouent un rôle dans le DT2 dont le pancréas avec les cellules alpha (cellules α) et bêta, le muscle squelettique, le tissu adipeux, le foie, l'intestin, les reins et le système nerveux central. Lors d'une augmentation des acides gras libres, l'obésité, la résistance à l'insuline et l'inflammation, les cellules β n'arrivent plus à compenser la résistance à l'insuline entraînant une diminution progressive de la fonction et de la masse des cellules β aboutissant à une augmentation la sécrétion du glucagon par les cellules α ainsi que d'une diminution de sécrétion d'insuline. Une fois l'insuline plasmique réduite elle s'accompagne d'une augmentation du taux de glucose dans le sang, un taux auquel l'ensemble des tissus sensibles au glucose tel le muscle squelettique et les adipocytes ne s'adaptent pas. Une accumulation des lipides dans les adipocytes conduit à une augmentation de la libération des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de la lipolyse. La libération des acides gras libres stimule le foie et augmente la production de glucose. En somme, la libération continue de glucose favorise l'hyperglycémie et aboutit au DT2 (**Riddy et al, 2018, Zheng et al, 2018**).

Le DT2 entraîne plusieurs complications, telles les maladies coronariennes et vasculaires périphériques qui semblent être la première cause de mortalité chez les patients atteints d'un DT2 (**Van Dieren et al, 2010**). D'autres complications également ont été rapportées comme l'insuffisance rénale suite à une néphropathie diabétique (**Van Dieren et al, 2010**), fragilité osseuse et risque de fracture (**Compston, 2017, Moayeri et al, 2017, Raska et al, 2017, Sundararaghavan et al, 2017**), neuropathie diabétique (**Feldman et al, 2017**), rétinopathie diabétique (**Lynch SK et Abramoff MD, 2017**) et maladies parodontales (**Peng et al, 2017**). À celles-ci s'ajoute une autre complication du DT2 qui touche le myocarde, la cardiomyopathie diabétique qui sera discutée en dessous dans le deuxième chapitre de ce manuscrit.

1.2. Prévalence:

Une étude épidémiologique avait montré que le nombre de personnes diabétiques dans le monde augmenterait jusqu'à 552 millions en l'an 2030. Cela est dû aux divers changements démographiques, dont le vieillissement des populations dans les pays développés, ainsi que l'effet de l'urbanisation qui mènent à avoir une vie plus sédentaire (**Whiting et al, 2011**). Le dernier rapport de l'organisation mondiale de la santé (OMS) parut en 2016 sur le diabète, estimait que le nombre de diabétiques dans le monde était en constante évolution et augmentation ayant atteint 422 millions en l'an 2014 (**Rapport mondial sur le diabète, OMS, 2016**). La prévalence du diabète entre 1980 et 2014 est illustrée dans la figure tirée de ce même rapport (Figure 1).

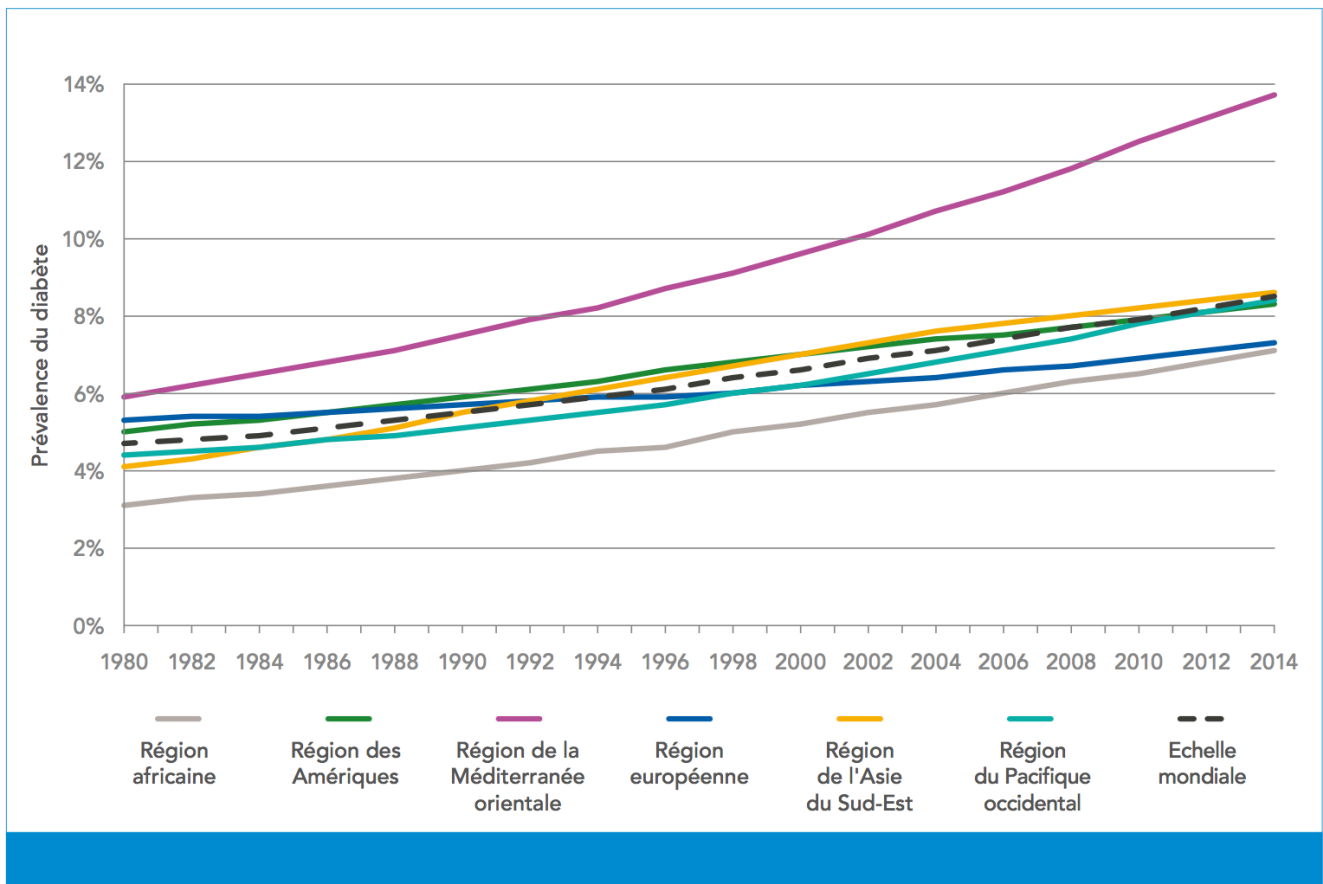


Figure 1: La prévalence du diabète dans le monde entre l'année 1980 et 2014.

Tirée du rapport mondial sur le diabète, OMS, 2016 (**Rapport mondial sur le diabète, OMS, 2016**).

Aussi la répartition de la prévalence fut bien illustrée et documentée dans l'annexe 1 par **Whiting et al, 2011**. Ces auteurs ont montré une augmentation exponentielle qui engendre bien évidemment une crainte importante auprès des pays concernés, ainsi qu'à l'autorité mondiale quant au traitement de cette maladie.

2. CARDIOMYOPATHIE DIABÉTIQUE:

2.1. Définition:

La cardiomyopathie diabétique est l'une des complications du DT2 pouvant être liée à la présence d'un taux élevé d'acides gras libres circulants (**Dresner et al, 1999**). Les causes sont diverses incluant l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie, l'hypertension, l'inflammation et le stress oxydatif associés à l'obésité et le DT2. Ces facteurs de risque pourraient mener à un déclenchement du processus de mort cellulaire des cardiomyocytes (**Liu et al, 2014**). La cardiomyopathie diabétique est caractérisée par divers événements structuraux et morphologiques dont une hypertrophie du ventricule gauche, ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur de la paroi myocardique. Il y a également une accumulation des lipides dans les cardiomyocytes de manière ectopique (localisation non normale) dans les cellules du péricarde, à laquelle s'ajoute une fibrose cardiaque. Cet ensemble de caractéristiques aboutissent à des complications fonctionnelles, comme l'altération de la fonction diastolique et systolique du ventricule gauche et également une diminution de l'élasticité ventriculaire pouvant amener à une défaillance cardiaque et engendrer un infarctus du myocarde (**Battiprolu et al, 2010; Wolf et al, 2017**). Une perturbation du métabolisme cardiaque est ainsi observée comme se sera documenté en dessous.

2.2. Métabolisme cardiaque:

2.2.1. La voie du glucose vs la voie des acides gras et β -oxydation:

Au niveau d'un myocarde sain, il semble y avoir une relation de réciprocité entre l'oxydation du substrat myocardique étant régit par le cycle de Randle (cycle glucose-acide gras) afin de générer de l'adénosine triphosphate (ATP) dans les mitochondries. De cette façon, l'oxydation des acides gras aboutit à une augmentation de l'acyl-CoA qui en inhibe la pyruvate déshydrogénase (PDH) alors que l'oxydation du glucose augmente le citrate cytosolique, un précurseur du malonyl-CoA qui inhibe la carnitine palmitoyltransferase 1 (Cpt1). Chez un sujet sain, le substrat prédominant est l'acide gras et le glucose ainsi qu'occasionnellement le lactate, le pyruvate et le cétone (figure 2) (**Chong et al, 2017**).

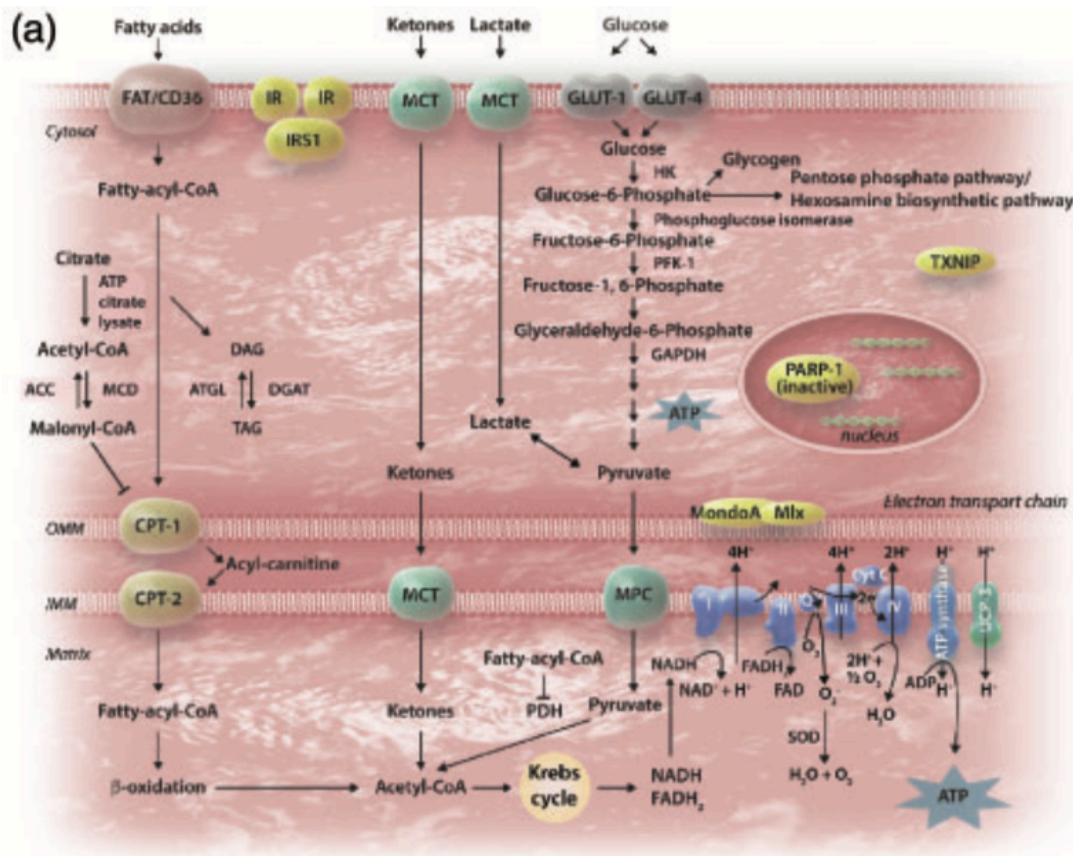


Figure 2: Métabolisme du glucose et des acides gras chez un coeur sain.

Schéma tiré de la publication de **Chong et al, 2017**.

Autorisation: **4279420727543**.

Ces deux voies métaboliques se voient perturbées lors d'un DT2 tel que se sera documenté ci-bas.

2.2.2. Impact du DT2 sur les ces deux voies métaboliques:

Lors du DT2 on assiste à une diminution de l'utilisation du glucose au niveau de son absorption, glycolyse et oxydation notamment par sa régulation via les transporteurs GLUT 1 et GLUT 4 (figure 3). Ainsi, les acides gras provoquent un effet négatif sur le transport du glucose via la résistance à l'insuline et sur l'oxydation du glucose en inhibant l'activité du complexe PDH. Quant aux voies non oxydatives (flèches ascendantes) du métabolisme du glucose telles la voie

polyol, la voie du produit final de glycation avancé (AGE) et la voie de la protéine kinase C, produisent un excès d'espèces réactives d'exogène (ROS) entraînant un stress oxydatif. Aussi, l'induction de la modification de la O-N-acétylglycosaminylation (O-N-GlcNAc) pour la biosynthèse de l'hexosamine perturbe les protéines de contractilité cardiaque, la sensibilité au calcium (Ca^{2+}), le cycle du Ca^{2+} et la fonction mitochondriale. Enfin, la modification des facteurs de transcription nucléaires (TFs) et des histones (Hs) comme l'H3 peut contribuer à des changements d'expression de gènes dans la cardiomyopathie diabétique (Brahma et al, 2017).

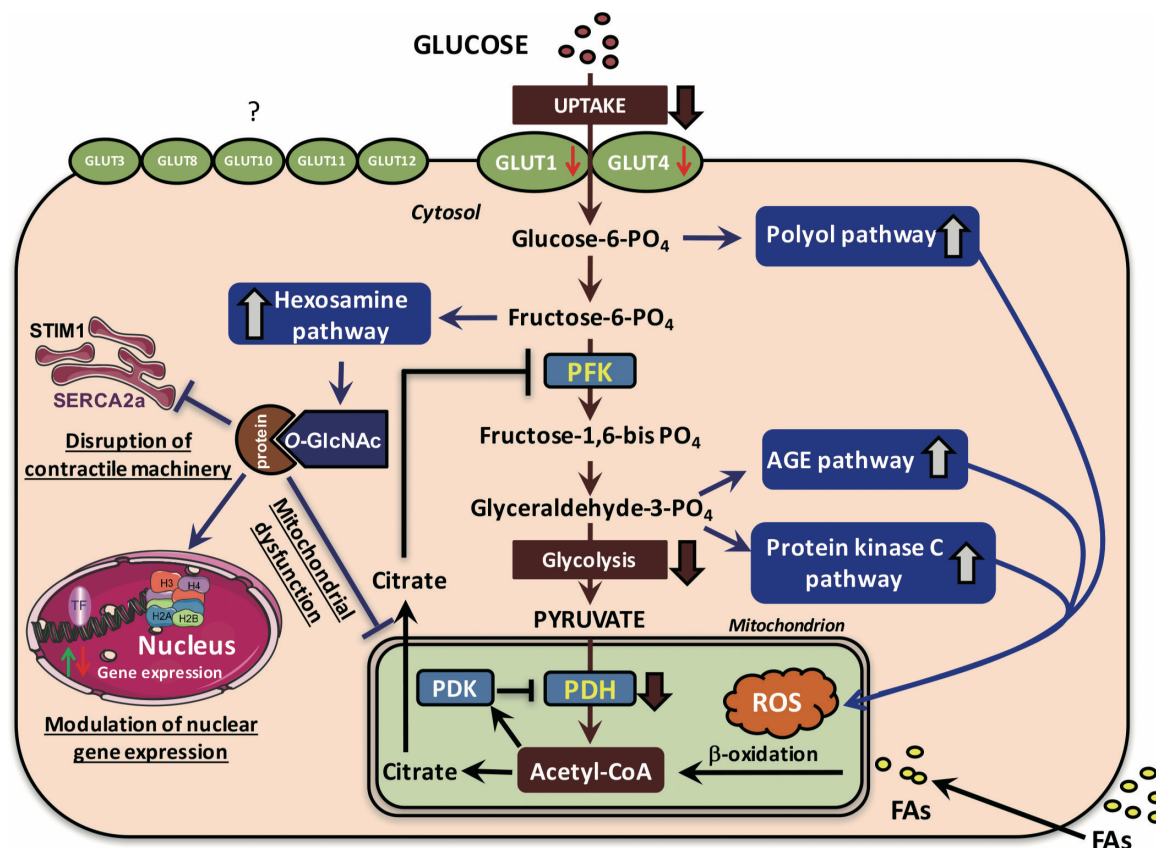


Figure 3: Le métabolisme du glucose lors de l'initiation et la progression de la cardiomyopathie diabétique.

Schéma tiré de la publication de Brahma et al, 2017. Tel étant cité dans la publication des auteurs, les flèches brunes indiquent les métabolites du glucose régulé durant le DT2. Les flèches noires indiquent les voies médiées par les acides gras modifiant l'utilisation du glucose. les

lignes bleues indiquent les voies induites par les voies non productrices d'ATP du métabolisme du glucose **(Brahma et al, 2017)**.

La cardiomyopathie diabétique est caractérisée par une accumulation des lipides au niveau du myocarde. Le métabolisme lipidique semble jouer un rôle important dans cette pathologie. Parmi les acteurs moléculaires, on retrouve l'implication du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes α (PPAR α). Ces derniers permettent l'expression de divers gènes responsables du métabolisme des acides gras (AG), de leurs transporteurs vers le milieu intracellulaire, des enzymes acyl-CoA synthétases permettant leur estérification en coenzyme A, protéines permettant leur acheminement intracellulaire et leur transport au niveau de la mitochondrie, ainsi que les différentes enzymes responsables de la β -oxydation dans la matrice mitochondriale **(Duncan et Finck, 2008)**. Au niveau des cardiomyocytes, comme le démontre Lee et al, parut en 2016, les PPARs seraient très importants dans le métabolisme lipidique de la cardiomyopathie diabétique **(Lee et al, 2016)**. Cette importance du rôle des PPARs peut également s'observer au niveau de la figure 4 publiée aussi par Lee et al, (2017) où l'on peut observer leur intervention dans les différentes étapes du métabolisme des acides gras afin d'arriver à la production de l'acétyl-CoA, qui en entrant dans le cycle de Krebs (représenté par TCA cycle dans la figure 4) va pouvoir générer du NADH,H⁺ et des FADH₂ qui vont rejoindre la membrane interne mitochondriale pour permettre la production d'ATP au niveau de la chaîne respiratoire **(Lee et al, 2017)**.

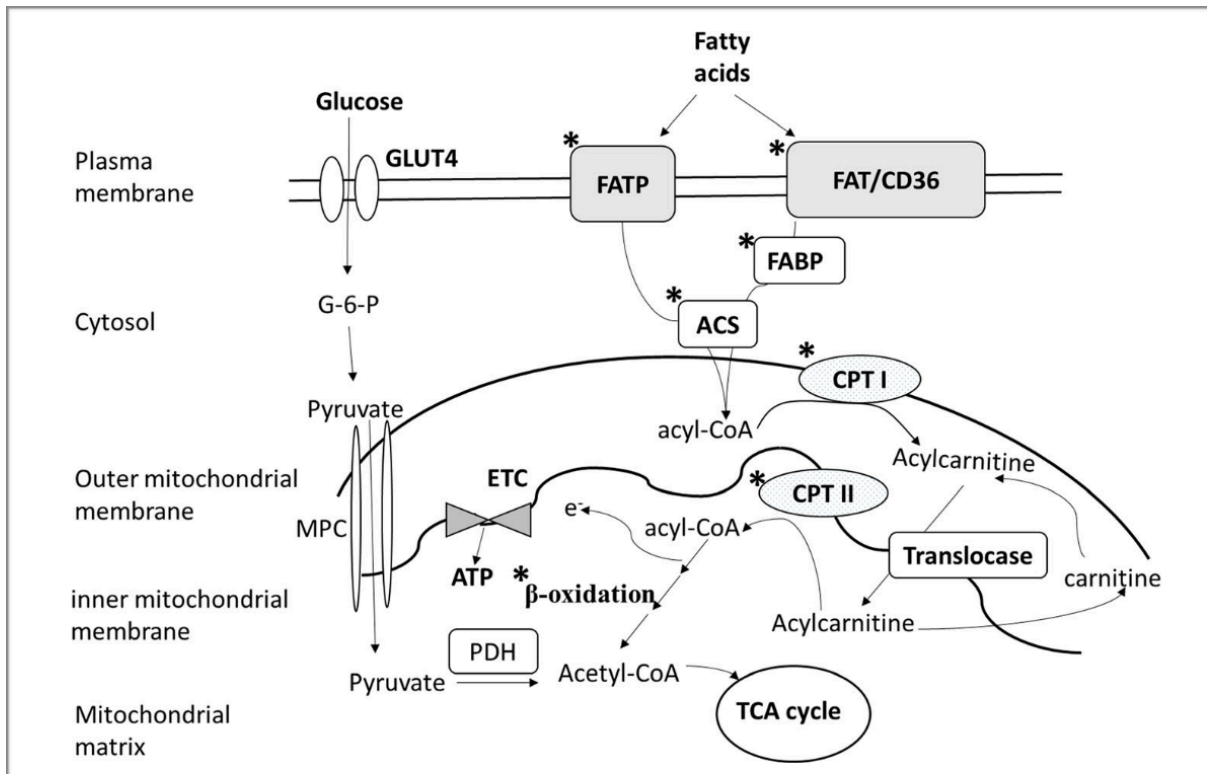


Figure 4: Le métabolisme des acides gras et de la β -oxydation lors de la cardiomyopathie diabétique.

Schéma tiré de la publication de Lee et al, 2017. Tel étant cité dans l'article des auteurs, les étoiles (*) représentent les sites où les PPARs interviendraient dans le métabolisme des acides gras (Lee et al, 2017).

Également, un excès d'acyl-CoA se trouve stocké sous forme de triacylglycérol (TAG) dans des gouttelettes lipidiques peuvent entraîner une accumulation d'intermédiaires toxiques tels que le DAG et les céramides. Aussi, le rôle de la protéine découplante UCP et de l'adénine nucléotide translocase (ANT) peuvent aboutir à une diminution de la capacité de la chaîne respiratoire mitochondriale (Hafstad et al, 2015).

3. INFLAMMATION:

3.1. Mécanisme de l'inflammation associé à la lipotoxicité et les acteurs impliqués:

La lipotoxicité semble jouer un rôle important dans le processus inflammatoire lors du DT2 comme il a été rapporté par Ertunc et Hotamisligil, (2016). Ainsi, l'accumulation des lipides toxiques comme les acides gras saturés tel le palmitate entre dans les cellules via la famille des protéines transporteuses d'acides gras (FATP) et entraîne une régulation à la hausse d'ARNsno cytosolique provoquant le stress du réticulum endoplasmique (RE). Le palmitate via la voie Janus kinase (JNK) entraîne la production du facteur de transcription AP-1 aboutissant à une réponse inflammatoire. Une production de ROS par les mitochondries entraîne une activation d'inflammasomes. Une synthèse de DAG et de céramide entraîne une résistance à l'insuline en inhibant le substrat du récepteur à l'insuline-1 (IRS-1) et de la protéine kinase AKT aboutissant à une régulation négative du récepteur à l'insuline (IR). Une activation du récepteur type Toll 4 (TLR4) entraîne une activation d'inflammasomes et une transcription de divers gènes pro-inflammatoires via les facteurs de transcription AP-1, le facteur de régulation de l'interféron (IRF) et le facteur nucléaire kappa B (NFkB) (Figure 5)(Ertunc et Hotamisligil, 2016).

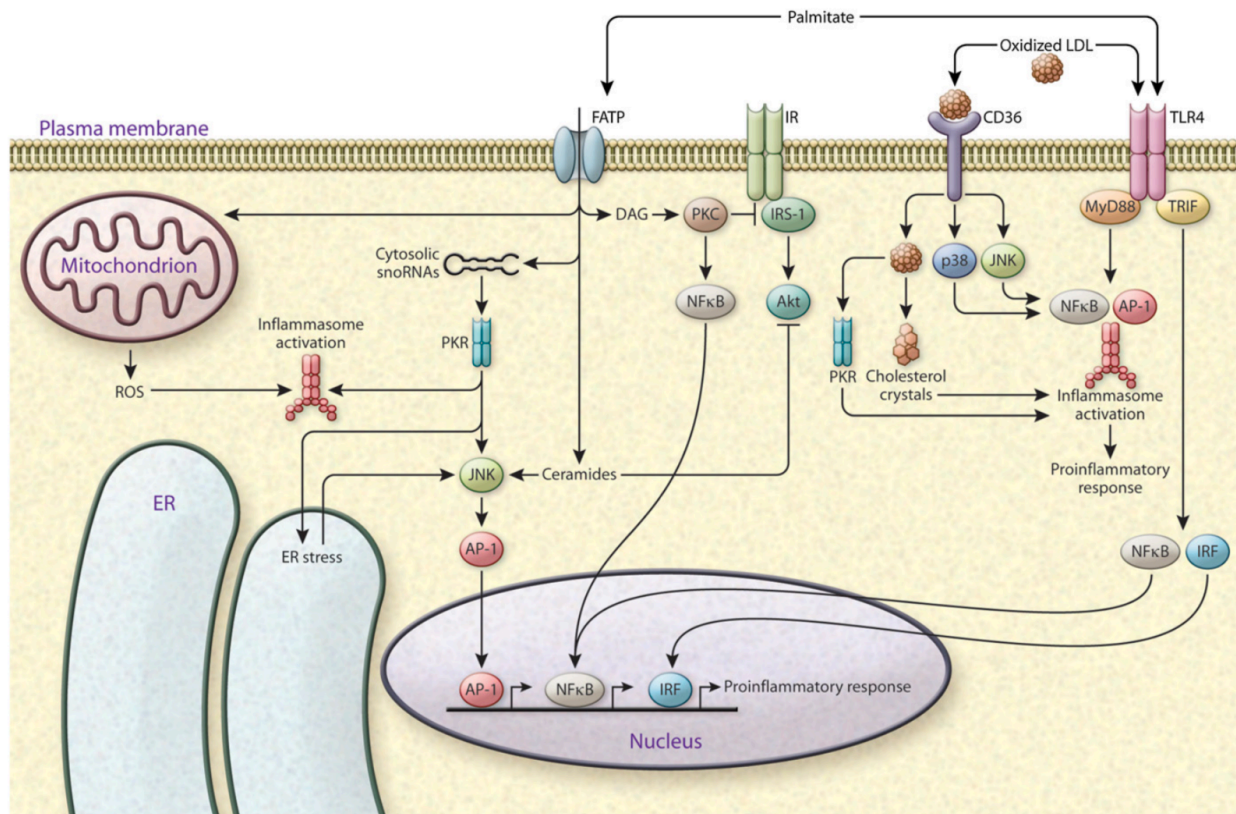


Figure 5: Effet de la lipotoxicité lors du processus inflammatoire.

Schéma tiré de la publication de **Ertunc et Hotamisligil, 2016**.

Parmi les gènes pro-inflammatoires exprimés que l'on peut retrouver, celui codant pour la cytokine pro-inflammatoire IL-6 qui sera discutée ci-bas.

3.2. IL-6 et les voies de signalisation:

Plusieurs mécanismes d'actions ont été démontrés comme intervenant dans le processus inflammatoire de l'IL-6. **Oberbach et al, (2012)**, ont pu rapporter dans leur article les trois principales voies de signalisations via lesquelles l'IL-6 agirait. Il s'agit; 1) de la voie MAP/ERK Kinase (MEK1), 2) la voie du phosphatidylinositol (PI3K) et 3) la voie du C-Jun N-terminal Kinase (JNK) (figure 6). Ils ont également montré que suite à un traitement au palmitate, un acide gras saturé connu pour être toxique, ce palmitate permettait la dissociation du complexe

I κ B phosphorylée-NF κ B via le TLR4, puis l'activation du NF κ B. Lorsque phosphorylé NF κ B va pouvoir être transloqué au niveau du noyau afin de permettre la transcription du gène de l'IL-6. De cette façon, l'IL-6 une fois exprimée va pouvoir être sécrétée et enclencher un signal autocrine inflammatoire qui s'effectue via le R-IL6.

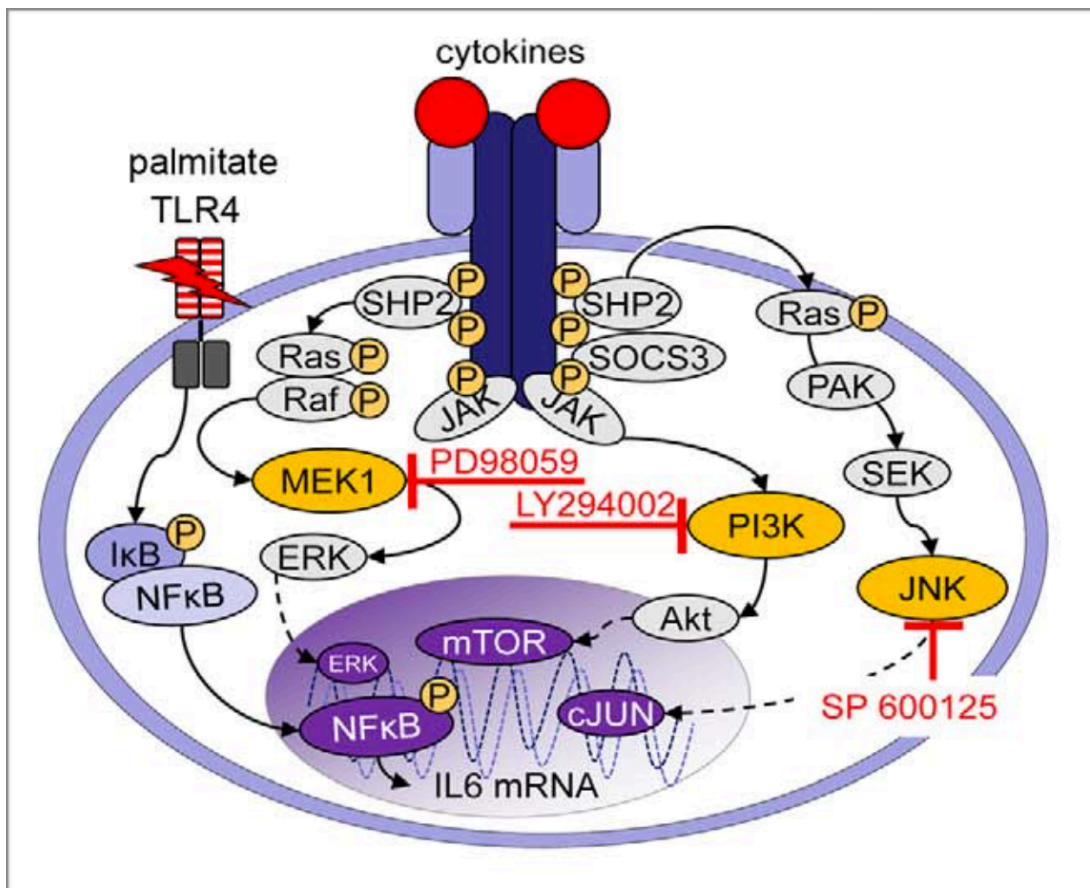


Figure 6: Les différentes voies de signalisation qui sont impliquées dans le mécanisme inflammatoire de l'IL-6.

Schéma illustrant les diverses voies de signalisation par lesquelles l'IL-6 agirait lors du processus inflammatoire. En rouge, les noms des inhibiteurs (Oberbach et al, 2012).

D'après **Oberbach et al, (2012)**, le supresseur de la signalisation des cytokines 3 (SOCS3) semble quant à lui réguler la transcription et la signalisation de l'IL-6, en inhibant la protéine du signal transducteur et activateur de la transcription (STAT) et la voie de signalisation Janus Kinase et STAT (JAK\STAT). Voir l'annexe 2.

D'autres auteurs ont également rapporté que le fait d'inhiber le TLR2 et le TLR4 permettait la diminution de l'accumulation des lipides intracellulaires aboutissant de cette façon à une amélioration de la fonction cardiaque en prévenant les divers complications causées par les lipides intracellulaires (**Cohen et al, 2017**).

L'IL-6 semble agir via deux formes de signalisation (Figure 7). Comme il a été rapporté récemment par Morieri et al, (2017), la première est la *signalisation classique* dans laquelle l'IL-6 se lie directement au récepteur de l'IL-6 (R-IL6) qui s'exprime sur la membrane plasmique des cellules et forme un complexe IL-6/R-IL6, auquel s'ajoute le co-récepteur gp130, afin de pouvoir initier la signalisation en aval. La deuxième est la *signalisation Trans* dans laquelle les cellules n'expriment pas de R-IL6. Néanmoins, on n'a la présence d'une forme soluble du R-IL6 (sR-IL6) qui se lie à l'IL-6. Une fois le complexe sR-IL6 et IL-6 formé, il s'associe aux co-récepteurs gp130 afin d'initier le signal et l'activation de la cellule cible. Cette signalisation comporte en plus de la présence des co-récepteurs gp130 membranaires, la présence de la forme soluble du gp130 (sgp130) qui en se liant au complexe sR-IL6 et IL-6, va pouvoir inhiber la signalisation de l'IL-6. Cet autre mécanisme a été observé dans des cardiomyocytes et des cellules endothéliales (**Morieri et al, 2017**).

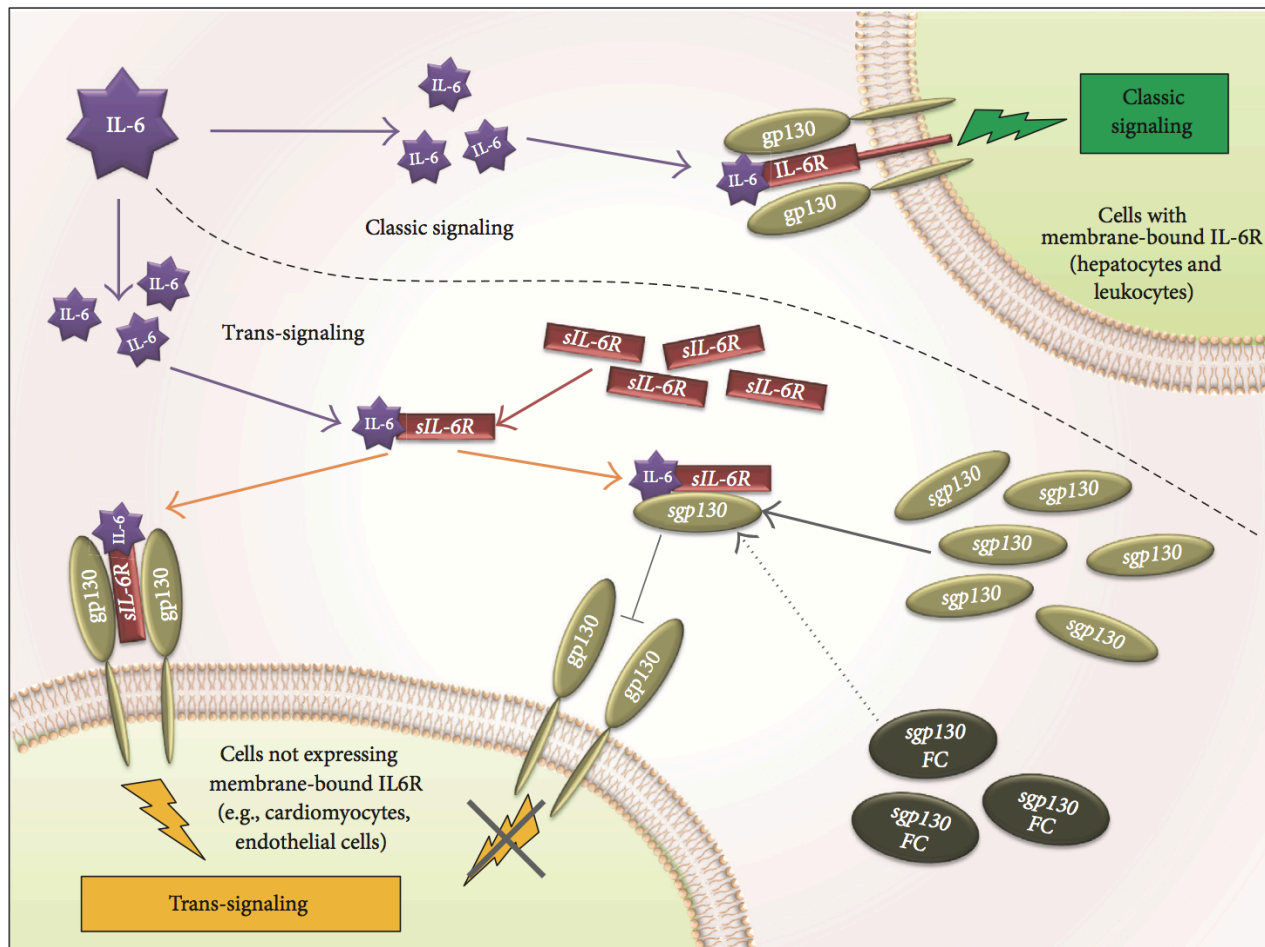


Figure 7: La signalisation classique et la signalisation Trans de l'IL-6.

Schéma montrant les deux formes de signalisation via lesquelles l'IL-6 effectue son activation du signal dans divers types cellulaires (Morieri et al, 2017).

3.3. L'IL-6 dans le DT2:

Il a été rapporté par Riddy et al, (2017) que lors de la résistance à l'insuline il y avait une production de l'IL-6 entraînant la transition, la différenciation et la polarisation des macrophages M2 (anti-inflammatoires) en macrophages M1 (pro-inflammatoires). Aussi, l'augmentation du taux d'IL-6 a été associé à une augmentation du facteur de coagulation D dimer (Aso et al, 2003). Le polymorphisme de l'IL-6 634C/G a été suggéré étant un facteur susceptible de jouer un rôle dans la néphropathie diabétique (Kitamura al, 2002). L'association de l'IL-6 avec le

TNF α entraîneraient une augmentation du stress oxydatif et réduirait la phosphorylation d'eNOS contribuant dans la dysfonction endothéliale coronaire (**Jonghae Lee et al, 2017**). L'IL-6 semble jouer un rôle inflammatoire important dans le développement de la néphropathie diabétique (**Senthilkumar et al, 2018**). Il semble y avoir une augmentation du taux d'IL-6 chez les femmes atteintes d'un DT2 comparé à des femmes saines (**Malenica et al, 2017**). Le polymorphisme du gène IL-6(-174 et -572G/C) est associé au développement de la rétinopathie diabétique (**Lu et al, 2017**). Il semble y avoir une corrélation entre la présence d'IL-6 et l'enzyme dégradant l'insuline (IDE) chez les DT2 (**Kurauti et al, 2017**).

3.4. L'IL-6 dans la cardiomyopathie diabétique:

Il a été rapporté par **Fontes et al, (2015)** que l'IL-6 semble jouer deux rôles différents au niveau du muscle cardiaque. Elle peut avoir un rôle protecteur permettant de prévenir la mort des cellules cardiaques lorsque présente à court terme. Cependant, ce rôle peut devenir pathogène lorsque l'exposition à l'IL-6 devient chronique engendrant des effets néfastes pouvant aboutir à une perte de fonction cardiaque, illustré dans la figure 8.

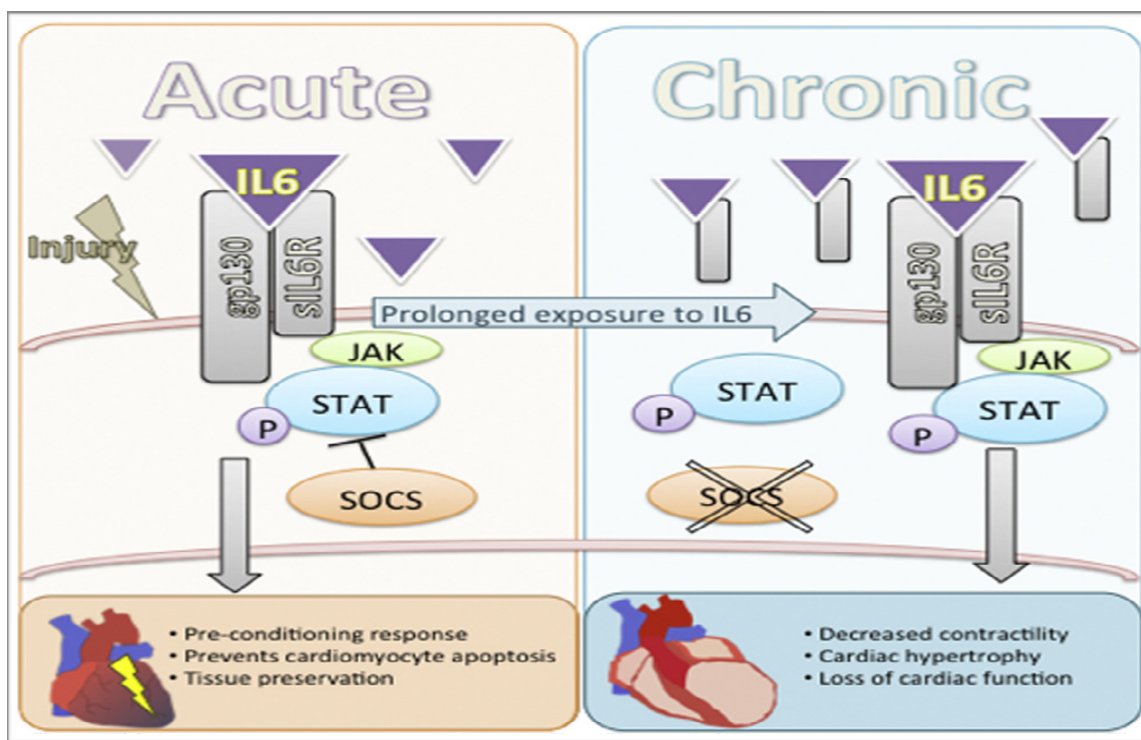


Figure 8: Le passage de l'IL6 de la forme protectrice vers la forme pathogène au niveau des cardiomyocytes.

Schéma montrant le rôle de la signalisation de l'IL6 dans le myocarde (Fontes et al, 2015).

Autorisation : 4270931092762.

Il a été démontré chez la souris que lorsqu'on avait une augmentation du taux d'IL-6, cela engendrait une diminution de la variabilité de la fréquence cardiaque (Hajiasgharzadeh et al, 2011). De façon intéressante, quant au mécanisme d'action, Al Rasheed, et al, (2016) ont pu observer dans leurs travaux chez un modèle de rat diabétique que la régulation à la baisse de la voie JAK/STAT permettait une atténuation de la cardiomyopathie. Une délétion au niveau de l'IL-6 pourrait diminuer le niveau de fibrose myocardique et améliorer la fonction cardiaque (Zhang et al, 2016). L'huile d'ail semble avoir un effet cardioprotecteur où elle permettrait d'inhiber la régulation à la hausse de la voie MAPK (JNK et ERK) et la voie MEK5/ERK5 dans des myocards de rats, ce qui réduit les facteurs d'hypertrophie comme le peptide natriurétique auriculaire (ANP) et le peptide cérébral natriurétique (BNP) et augmente la contractilité

cardiaque (**Chang et al, 2011**). L'utilisation de la tanshionone IIA (TSN) semble avoir un effet cardioprotecteur qui entraine une diminution du taux d'IL-6 via la voie AKT (**Sun et al, 2011**). En inhibant la voie NFkB cela permettait de diminuer le taux d'IL-6 aboutissant à un effet protecteur (**Liao et al, 2017**). L'Ulinastatine semble avoir un effet protecteur entrainant une diminution du taux d'IL-6 en diminuant la voie MAPK (**Wang et al, 2017**). Aussi, la dihydromyricetine semble avoir un effet protecteur de la fonction cardiaque en diminuant le taux d'IL-6 (**Wu et al, 2017**). Ainsi, divers de ces études montrent combien l'IL-6 joue un rôle conséquent dans la cardiomyopathie diabétique. Ce travail va aussi se pencher sur le rôle qu'a IL-6 dans le métabolisme lipidique de cette pathologie.

II. PRÉALABLES, JUSTIFICATION ET OBJECTIFS DU SUJET:

2.1. Préalables et justification du sujet:

Les travaux de ce mémoire avaient pour objectifs la compréhension des mécanismes de la lipotoxicité cardiaque lors de la cardiomyopathie diabétique, et notamment de comprendre les divers voies du métabolisme lipidique qui seraient perturbées.

Le coeur tient son énergie en majorité des acides gras qui augmentent chez les diabétiques. D'ailleurs, Borisov et al, (2018), ont montré une accumulation des lipides dans le muscle cardiaque chez les patients atteints de DT2 qui entraînerait une importante dysfonction cardiaque, lipotoxicité et mort cellulaire du muscle cardiaque (**Borinov et al, 2008**).

Dans nos expériences, nous utilisons deux acides gras qui sont considérés comme étant les plus abondants dans l'apport nutritif lipidique chez l'Homme. Le premier est le palmitate, un acide gras saturé connu pour être toxique. Le second est l'oléate qui est un acide gras mono-insaturé connu pour ne pas être toxique.

Dans l'article de notre laboratoire d'**Haffar et al, (2015)** ils ont montré que le traitement des cardiomyocytes au palmitate (300µM) pendant 24h augmentait le taux d'ARNm du TNFα ainsi que de l'IL-6. Ceci était observé avec un effet dose réponse avec 50, 100 et 300µM pendant 24h de traitement. Suite à cela, plusieurs traitements ont été utilisés afin de savoir qui du TNFα et de l'IL-6 pouvait aboutir à la lipotoxicité dans les cardiomyocytes. Ainsi, lorsqu'on traitait au palmitate combiné à de l'oléate, il y avait une réduction du taux d'ARNm de l'IL-6, tandis que le taux de l'ARNm du TNFα ne changeait pratiquement pas. D'autres traitements combinés ont également été utilisés, notamment le traitement au palmitate combiné à du AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide), un agoniste de l'AMPK (AMP-activated protéine kinase), et aussi un autre traitement le palmitate combiné avec des agonistes des PPARs (deux agonistes étaient utilisés: GW501516 ciblant le PPARδ et le Wy14643 ciblant le PPARα). L'ensemble de ses traitements montraient une diminution du taux d'ARNm de l'IL-6 qui s'accompagnaient d'une diminution de la mortalité dans les cardiomyocytes, tandis que l'effet sur l'ARNm du TNFα était une diminution dans le traitement comportant l'agoniste AICAR,

mais pas pour les traitements qui comportaient les deux agonistes des PPARs. En somme, les divers expériences ont abouti à une conclusion qui serait que l'IL-6 aboutirait à une lipotoxicité des cardiomyocytes ainsi qu'à une régulation à la baisse des PPARs (δ et α).

D'autres résultats de notre laboratoire (annexe 3) avaient montré que lorsqu'on traitait des cardiomyocytes avec 300 μ M de palmitate on observait au niveau transcriptomique, une augmentation significative du taux du TLR2 au bout de 8h et 16h de traitement, mais pas au bout de 24h. Par contre, le récepteur TLR4, était quant à lui augmenté seulement au bout de 16h, mais pas au bout de 8h et 24h.

De manière intéressante avant de faire les expériences de ce manuscrit, d'autres résultats préliminaires de notre laboratoire ont été produits après extinction du gène de l'IL-6 (Knock-down) dans les cardiomyocytes pour vérifier l'effet d'un traitement au palmitate ou à l'oleate.

Pour cela, les cardiomyocytes étaient infectés avec des lentivirus comportant le siARN anti IL-6 (deux formes furent utilisées). La figure 9A démontre une diminution du taux d'IL-6 qui été exprimé dans les cardiomyocytes.

Par la suite, ils ont pu montrer que dans les cardiomyocytes après une infection avec des lentivirus comportant des siARNs anti IL-6 et un traitement au palmitate induisait une augmentation de la mortalité cellulaire que l'IL-6 soit inactivé ou pas. Par contre, lorsque les cardiomyocytes ont été infecté avec les siARNs anti IL-6 et traités à l'oleate, il y avait une augmentation du taux de mortalité seulement dans les cellules traitées avec le siARN anti IL-6, mais pas avec le siARN Scramble (figure 9B et C):

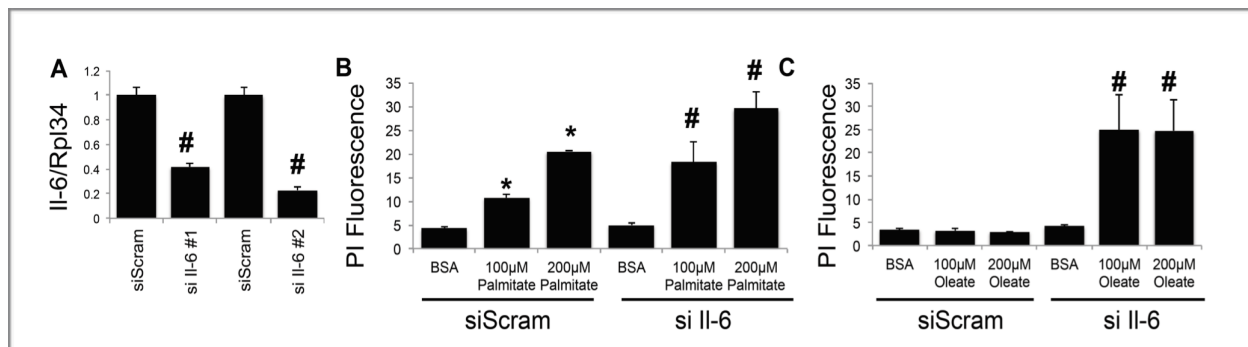


Figure 9: L'effet de l'extinction du gène de l'IL-6 sur la viabilité des cardiomyocytes.

La figure était réalisée avec les travaux fait par: Félix-Antoine Brébé-Simard, et récupérée auprès du directeur du laboratoire. (Rpl34: gène rapporteur en qPCR). La méthode utilisée pour la vérification de la viabilité est l'essai au iodure de propodium (PI).

Ces résultats ont été d'une grande surprise, car on révélait une mortalité cellulaire avec le traitement à l'oléate après inactivation de la synthèse de l'IL-6. D'autre part, le palmitate est devenu encore plus toxique après l'inactivation de l'IL-6.

Ces travaux ont amené le laboratoire à se pencher sur le rôle que jouait l'IL-6 dans le métabolisme lipidique suggérant que l'IL-6 pouvait jouer un rôle important mais à une certaine concentration: quand exprimé fortement, il semblait être létal, alors que l'abolir totalement entraînait le même effet de létalité. On ayant prit en compte l'ensemble des résultats antérieurs de notre laboratoire, dont ceux publiés dans l'article d'**Haffar et al, (2015)** et aussi des résultats préliminaires sur l'extinction du gène de l'IL-6 dans les cardiomyocytes, on n'a voulu s'intéresser au rôle potentiel que pouvait jouer l'IL-6 dans le métabolisme lipidique de ces cellules.

2.2. Objectifs:

1. Mesurer le taux d'IL-6 qui serait sécrété par les cardiomyocytes en condition de lipotoxicité en utilisant l'acide gras saturé connu pour être toxique le palmitate.
2. Mesurer l'effet d'un taux d'IL-6 endogène physiologique sur la viabilité des cardiomyocytes en utilisant de l'IL-6 recombinante combinée avec de l'oléate.
3. Mesurer l'effet d'un taux d'IL-6 endogène physiologique sur les lipides intracellulaires des cardiomyocytes en utilisant de l'IL-6 recombinante combinée avec de l'oléate.

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES:

3.1. Préparation des acides gras:

On utilise dans nos expériences de l'albumine de sérum bovin (BSA) (Sigma, A7030-100G) dans du 150mM NaCl (Sigma, S3014-5KG) comme véhicule permettant de transporter les divers acides gras utilisés pour les divers traitements des cellules. On dissout l'oléate sodium (Sigma, 07501) dans du méthanol que l'on rajoute ensuite à 0.17mM de BSA (Un ratio de 6:1 M), cela se fait sous une petite agitation pendant 1heure à 37°C, une solution qui va être conservée en aliquots à -80°C jusqu'à utilisation. Le palmitate (Sigma, P9767) aussi est dissout dans 150mM de NaCl avec une température de 70°C. Le mélange est ensuite ajouté à 0,17 mM de BSA (Un ratio de 6:1 M), toujours sous une petite agitation pendant 1heure à 37°C , puis est conservé en aliquots à -80°C jusqu'à utilisation. Des solutions qui vont être diluées avec du milieu de culture lors des traitements cellulaires.

3.2. Isolation et culture cellulaire des cardiomyocytes primaires:

On procède à l'anesthésie de bébés rats portés par des rats femelles de la lignée SPRAGUE DAVLEY, âgés d'un jour provenant de la compagnie Charles River avec de l'isofluorane (Baxter, CA2L9100-100ml). On utilise de l'éthanol 70% (Commercial alcohols, P16EA95) pour s'assurer que l'ensemble des instruments à utiliser sont stériles lors de la microchirurgie. On procède à l'isolation des coeurs néonataux en s'assurant de prendre le tissu ventriculaire que l'on coupe en petits morceaux et que l'on dispose dans une solution tampon de Hanks, constituée de: 137mM NaCl, 5.36 mM KCl (ACROS, 193780010) , 0.81mM MgSO₄ (ACROS, 41348-5000), 5,55mM dextrose (ACROS, 41095-0010), 0.44 mM Na₂HPO₄ (ACROS, 204855000), 20mM HEPES (Sigma, H3375-500G) et 50µg/ml de gentamicine. Après plusieurs lavages dans ce tampon, on va pouvoir digérer avec la même solution de tampon de Hanks à laquelle on rajoute de la collagénase-II (50 unités/ml)(Worthington, LS004176), ainsi que 0,36µM de CaCl₂ (Sigma, C-3306-100G). On fait plusieurs cycles d'environ 10 minutes chacun sous agitation à 37°C, jusqu'à digestion de la totalité du tissu ventriculaire. À chaque fois que la solution de digestion devient trouble au bout de chaque cycle de digestion, on va pouvoir centrifuger et

récolter le surnageant dans une solution de sérum de veau fœtal(SVF) (Wisent, 090-150) que l'on met directement dans un bac de glace. Une fois l'ensemble du tissu digéré, on le centrifuge et le culot récolté contenant les cardiomyocytes et des fibroblastes est ensuite transféré dans un pétri (Fisher Scientific, 12-556-002) avec un milieu de culture contenant: DMEM/F12 (Fisher Scientific, SH3002302), 10% de SVF. On les incube pendant 30 minutes à 37°C pour laisser les fibroblastes adhérer au pétri, afin de se débarrasser d'eux. Au bout de ce temps, on pourra transférer le surnageant contenant les cardiomyocytes dans des pétris, contenant: DMEM/F12, 2% de SVF, 0.5% pénicilline/streptomycine (Fisher Scientific, SV30010) et 100µM de bromodéoxyuridine (BrdU)(Sigma, B5002-250G), ce dernier étant utilisé pour éviter la prolifération des fibroblastes contaminants, pour ensuite utiliser la densité souhaitée. Cependant, les cardiomyocytes primaires néonataux récoltés restaient environs 6 jours à 37°C avant tout traitement.

3.3. Culture cellulaire des H9C2:

On n'a utilisé une ligne cellulaire secondaire de cardiomyoblastes de rat (H9C2) commandée chez ATCC®(ATCC®, CRL- 1446TM). Ceci étant donné que l'utilisation des cultures primaires était très coûteuse, nous avons optimisé nos expériences sur ces cellules afin de passer ensuite à la culture primaire de cardiomyocytes de rats. Les H9C2 étaient cultivées dans du DMEM/F12 additionné de 10% de SVF et 0.5% de pénicilline/streptomycine à 37°C et une humidité atmosphérique dans l'incubateur à 5% CO₂. Elles ont été utilisées pour évaluer l'effet de l'addition de l'IL-6 recombinante sur la viabilité des H9C2 traitées avec de l'oléate et/ou IL-6 recombinante à différentes concentrations souhaitées pendant 24h à 37°C. On pouvait ensuite faire le test de viabilité tel que décrit précédemment.

3.4. IL-6 recombinante:

Pour les divers traitements à l'IL-6 recombinante, nous avons utilisé de l'IL-6 recombinante provenant de rat (Sigma-I0406), qui était exprimée chez *Escherichia Coli*. Son poids moléculaire est d'environ 22kDa. Elle était présente dans une solution filtrée de 0.2µm d'acétate de sodium à 50mM, pH 4 et de la BSA.

3.5. Test de viabilité:

La viabilité était déterminée par l'utilisation de l'essai au Iodure de Propidium (PI). Les cardiomyocytes primaires néonataux ont été traités avec de l'oléate et/ou palmitate et/ou IL-6 recombinante ou BSA, ainsi que pour chaque temps souhaité. Ils étaient présents en quatre exemplaires. Après l'arrêt du traitement, on incubait ces cardiomyocytes avec du PI pendant 30 minutes à 37°C. Au bout de cela, on pouvait lire les différences d'intensité de fluorescence (535nm excitation/617 nm émission) grâce à un lecteur de microplaque synergy2 (BioTek).

3.6. La méthode immuno-enzymatique ELISA pour l'IL-6:

Avec un kit Elisa d'IL6 de rat (Life Technologies, KRCOO61), on n'a pu mesurer le taux de d'IL6 sécrété dans le milieu extracellulaire par les cardiomyocytes en utilisant leur milieu de culture qu'on n'a récolté au bout des différents temps de traitements. On n'a utilisé l'ensemble des instructions présentes dans le protocole inclus dans le kit pour pouvoir réaliser une lecture d'absorbance à 450nm dans un lecteur de microplaque synergy2.

3.7. Isolation des lipides par la méthode de Bligh et Dyer:

On procédait à une préparation de petits tubes à essais en verre (VWR Scientific Product, 60825-469) dans lesquels on incorporait 1.9ml comportant un ratio de 1:2 (v:v) de CHCl_3 :MeOH (Fisher Scientific, CAS67-56-1), respectivement avec des volumes de 0.63:1.26ml. Ensuite, on rajoutait les échantillons cellulaires qui étaient traités avec différents traitements dans ces tubes à essais, que l'on vortex de 1 à 2 secondes (sec) pendant 2 minutes(min). On rajoutait à chaque mélange 1.25ml de CHCl_3 , on vortexait de 1 à 2 sec pendant 2min. Puis, on rajoutait 1.25ml d' H_2O pour chaque tube que l'on vortexait de 1 à 2 sec pendant 2 min. On centrifugeait à une intensité de 1000 RPM (rotations par minute) pendant 5 min à température ambiante, une étape au bout de laquelle on arrivait à avoir au niveau des tubes, deux phases. Une phase aqueuse en haut et une autre phase organique en bas. Enfin, on procédait à la récolte de la phase organique que l'on transférait dans des nouveaux petits tubes à essais en verre. Ces tubes étaient soumis à un courant de gaz d'azote afin de les assécher, pour être utilisés pour la chromatographie sur couche mince. Si les échantillons n'étaient pas

directement utilisés, ils étaient recouvert de film transparent et gardés à -80°C pour usage ultérieur.

3.8. Chromatographie sur couche mince (CCM):

Après l'isolation des lipides des cardiomyocytes par la méthode de Bligh et Dyer mentionnée ci-dessus, on pouvait dissoudre les échantillons contenus dans les petits tubes à essais en verre dans 50µl de chloroforme (Sigma Aldrich, C2432-2.5L) par tube que l'on vortexait pour homogénéiser. Ensuite, on déposait une série de marqueurs avec les trois différents triglycérides (TG): Triacylglycérol (TAG), Diacylglycérol (DAG) et le Monoacylglycérol (MAG) (Sigma-1787-1AMP) sur une plaque de silice (M Analytical Chromatography, 1.05608.001), ainsi que des gouttes issues des divers échantillons à analyser.

Cette plaque était placée dans un récipient vertical en verre contenant 151,5 ml, soit 75:75:1.5ml respectivement de chloroforme: Diethylether(Sigma Aldrich, 346-136-1L): Acide acétique (Sigma Aldrich, 320099-500ML), ainsi que du papier Western blot épais (Immunoblon-P®, IPVH0010). Puis, on fermait le récipient avec son couvercle également en verre, afin de permettre la migration des différentes TG pendant environ 60min. Au bout de ce temps, on enlevait la plaque de silice et on la laissait sécher à l'air libre pendant environ 30min. Enfin, on révélait et visualisait les tâches laissées par la migration des TG, en mettant et en retirant rapidement la plaque dans un bain de rhodamine (Sigma Aldrich, 02558-100ML) (1 à 2 secondes). Alors, on laissait la plaque séchée à nouveau à l'air libre environ 30min. Au bout de ce temps, on pouvait réaliser une photo qui nous permettrait de quantifier l'intensité des différentes tâches.

3.9. Analyse statistique:

Dans nos résultats les graphiques illustrent des barres représentant un écart-type pour la moyenne (Moyenne \pm Écart-type). Nous avons utilisé le test ANOVA permettant de comparer 3 groupes ou plus avec le test post-hoc Tukey. La valeur $p < 0.05$ indique que le résultat comparé est statistiquement significatif.

IV. RÉSULTATS:

4.1. Mesure du taux d'IL-6 sécrétée par les cardiomyocytes primaires:

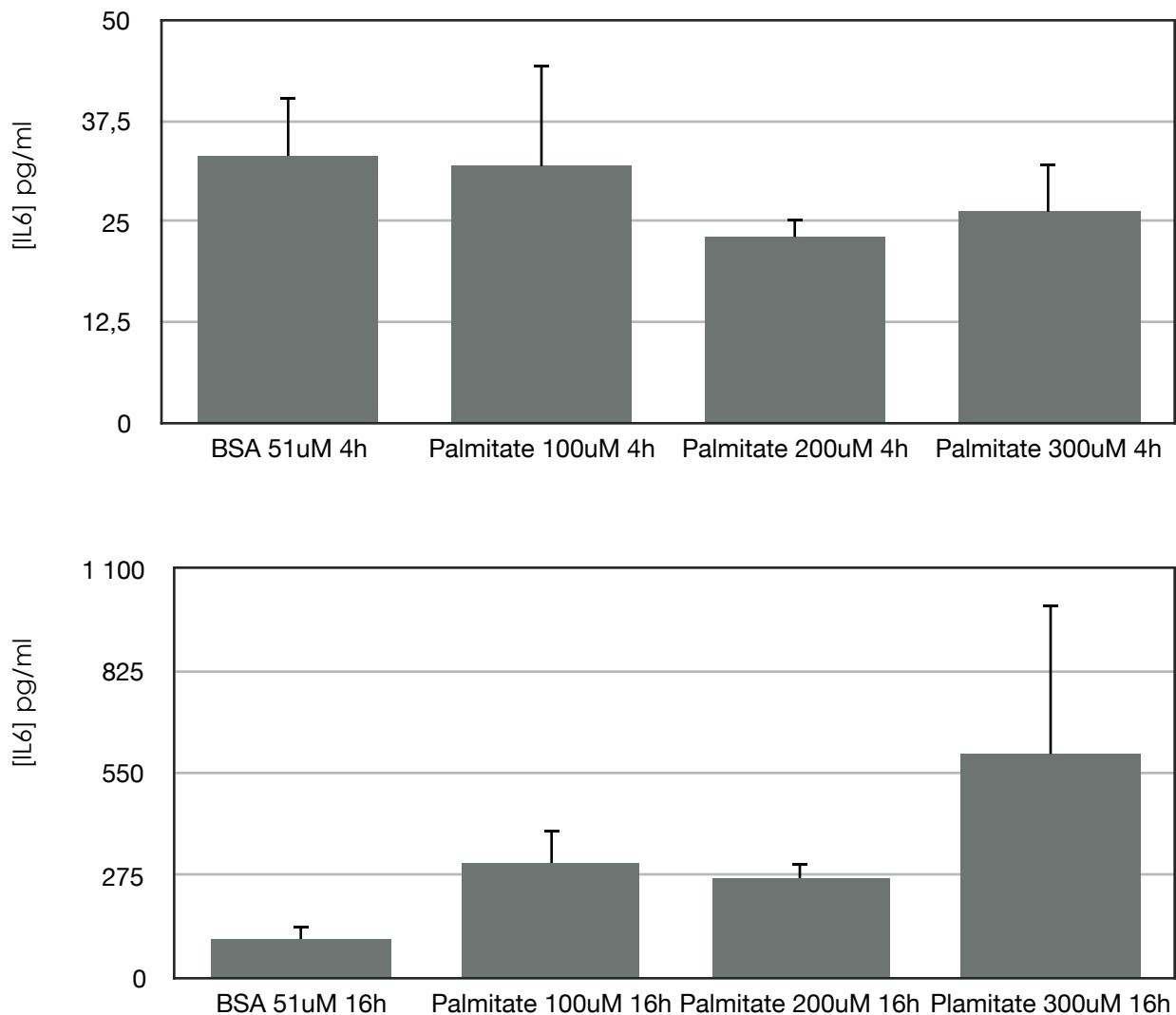


Figure 10: Taux d'IL-6 sécrétée par les cardiomyocytes primaires lors de la lipotoxicité.

Après un traitement au palmitate le taux d'IL-6 sécrétée dans le milieu extracellulaire par les cardiomyocytes primaires de rats ne semble pas changer au bout de 4h (Figure 10, du haut) mais on peut observer une augmentation au bout de 16h (Figure 10, du bas) étant plus importante avec une concentration de 300 μ M correspondant à environ 0.6 ng/ml (condition lipotoxique). Les

statistiques ne pourront être fait car une seule expérience pour chaque figure. Ce résultat nous permet de mesurer le taux d'IL-6 qui a été sécrété par les cardiomyocytes primaires dans le milieu extracellulaire lors de la condition lipotoxique engendrée par le palmitate. On n'a su préalablement dans les travaux d'**Haffar et al, (2015)** qu'il y avait une augmentation significative du taux d'IL-6 lors du traitement au palmitate, lequel s'accompagnait d'une importante mortalité cellulaire. Cette même augmentation fut également observée chez **Oberbach et al, (2012)** dans des cellules musculaires lisses. De cette manière, on a voulu connaître qu'elle était la concentration d'IL-6 qui serait impliquée lors de la lipotoxicité induite par le palmitate.

4.2. L'effet de l'addition de l'IL-6 recombinante sur la viabilité des cardiomyocytes H9C2:

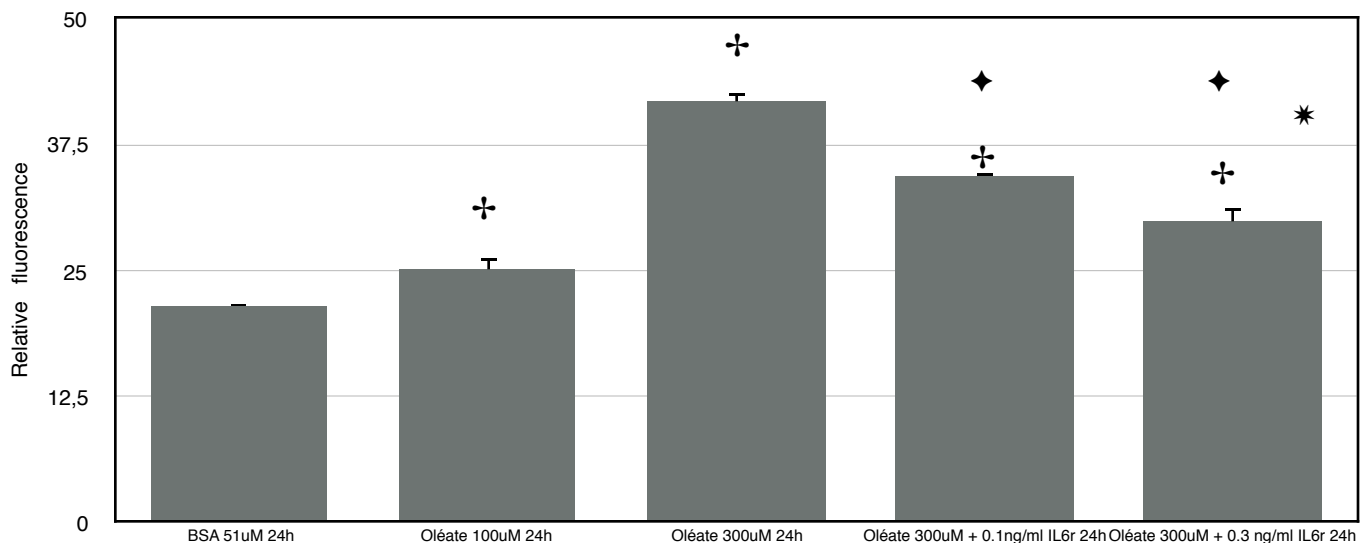


Figure 11: L'IL-6 diminue le taux de mortalité dans les cardiomyocytes H9C2.

(+ Indique $p < 0.05$ vs. le contrôle traité à la BSA 51uM, ♦ Indique $p < 0.05$ vs. le traitement à l'oléate 300uM, * Indique $p < 0.05$ vs. le traitement à l'oléate 300uM + 0.1 ng/ml IL-6r). IL6r pour IL-6 recombinante.

Dans cette figure 11, il est important d'observer qu'un traitement à l'oléate avec une forte concentration à lui seul provoquer une mortalité dans notre modèle cellulaire de cardiomyocytes, la lignée H9C2 mais pas dans la culture primaire, un effet qui diminue avec la co-administration de l'IL-6 recombinante. Selon cette expérience, le traitement à l'IL-6 recombinante combinée avec de l'oléate 300 μ M réduit le taux de mortalité dans la lignée cellulaire H9C2 en comparant aux traitements avec de l'oléate à 300 μ M seul. Cette diminution est caractérisée par un effet dose-réponse avec les deux différentes concentrations de l'IL-6 recombinante utilisées, soit avec 0,1ng/ml et 0,3 ng/ml pendant 24h. Il est intéressant de voir que certaines concentrations d'IL-6 recombinante ont permis de diminuer le taux de mortalité cellulaire suggérant un rôle lipoprotecteur de l'IL-6 dans les cardiomyocytes. D'ailleurs, nos travaux montrés préalablement dans nos résultats préliminaires (Figure 9) soutiennent nos résultats de la figure 11 qui montraient que l'abolition de l'IL-6 provoquait une forte mortalité cellulaire dans les cardiomyocytes primaires traités à l'oléate. Ainsi, abolir totalement l'IL-6 ou avoir un taux élevé d'IL-6 seraient lipotoxiques et provoqueraient la mort cellulaire. La figure 11 montre clairement l'importance d'avoir un taux d'IL-6 qui serait lipoprotecteur et préviendrait la mort cellulaire.

4.3. L'effet de l'addition de l'IL-6 recombinante sur la lipotoxicité des cardiomyocytes H9C2:

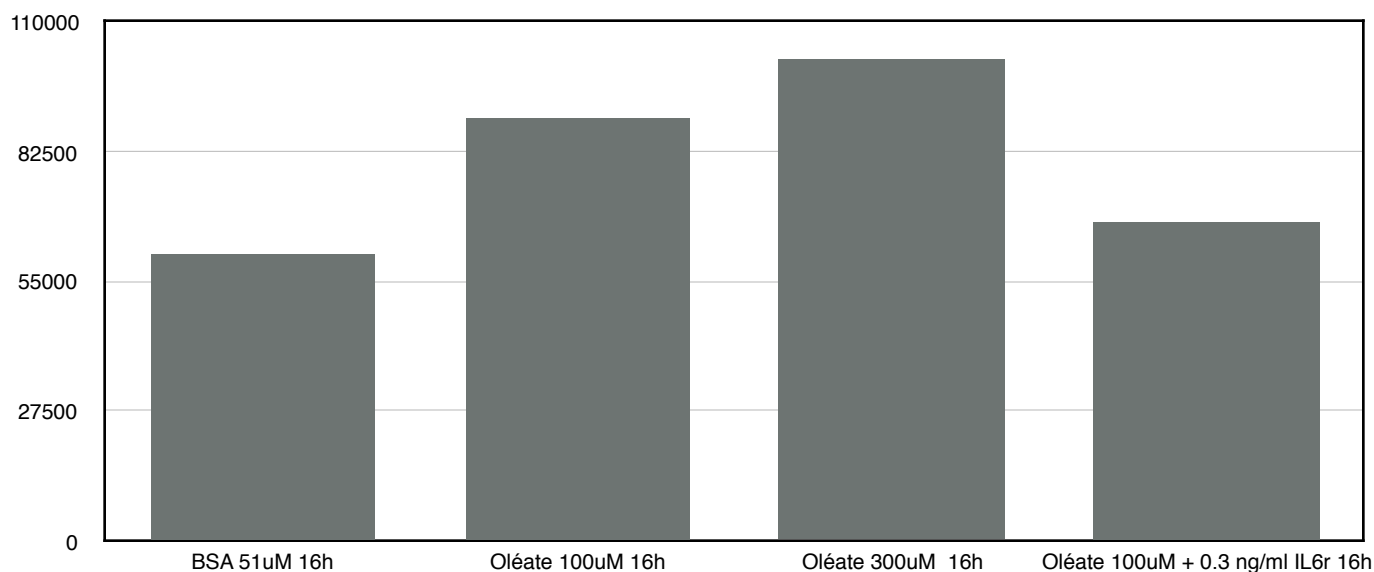


Figure 12: L'IL-6 semble diminuer le taux des triglycérides dans les cardiomyocytes H9C2.

(Le résultat obtenu en chromatographie sur couche mince est présent dans les résultats supplémentaires, résultat supplémentaire 1)

Dans les cellules H9C2 de la figure 12, on a observé en chromatographie sur couche mince que lorsqu'on traitait ces cellules pendant 16h avec l'oléate 100 μ M et l'IL-6 Recombinante (0.3ng/ml) il y avait une diminution du taux des triacylglycérols (TAG) comparé au traitement avec de l'oléate seul. Les écarts types et statistiques ne pourront être fait car une seule valeur par condition et une seule expérience pour cette figure. Ce résultat suggère un potentiel effet de l'IL-6 recombinante dans les cellules H9C2 qui est une diminution de l'accumulation des lipides intracellulaires et de la lipotoxicité en favorisant la β -oxydation, comme le montrait les travaux d'**Haffar et al, 2015**. Ainsi, l'IL-6 aurait probablement un rôle cytoprotecteur et cardioprotecteur dans le métabolisme lipidique des cardiomyocytes.

V. DISCUSSION:

Les résultats de ce travail nous ont permis de montrer que l'IL-6 jouait un rôle conséquent dans le métabolisme lipidique des cardiomyocytes. Cette cytokine semble augmenter de manière importante lors de la lipotoxicité produite par le palmitate. L'IL-6 se trouve avec une concentration importante dans le milieu extracellulaire et diminue le taux de mortalité dans la lignée cellulaire H9C2. En ayant utilisé l'IL-6 recombinante, on a pu observer une diminution du taux de mortalité engendré par le traitement à l'oléate (300μM). D'autre part, on a pu observer que l'IL-6 diminuait les TAG dans la lignée cellulaire H9C2 après un traitement à l'oléate.

L'IL-6 est sécrétée dans le milieu extracellulaire des cardiomyocytes après un traitement avec différentes concentrations de palmitate pour 16h sans changement à 4h. Le niveau de sécrétion est à environ 0,6ng/ml. Ces travaux semblent appuyer qu'un taux élevé d'IL-6 jouerait un rôle conséquent lors de la lipotoxicité entraînant une mortalité cellulaire significative des cardiomyocytes déjà observée précédemment (**Haffar et al, 2015**). La lipotoxicité du palmitate est aussi observée dans les cellules musculaires lisses de la vessie, où cet acide gras saturé entraîne une augmentation du taux d'IL-6 engendrant une importante mortalité et une perturbation de plusieurs fonctions cellulaires (**Oberbach et al, 2012**). Cette lipotoxicité fut également montré par **Krogmann et al, (2011)** en mettant en évidence que dans des cellules endothéliales d'artères coronaire le traitement au palmitate induisait une augmentation de divers cytokines inflammatoires incluant l'IL-6 montrant ainsi le potentiel lipo-inflammatoire des acides gras saturés dans le système vasculaire. Par contre, un traitement avec des acides gras insaturés tel que l'oléate n'a pas d'effet toxique sur les cellules endothéliales en culture. Un autre groupe de recherche de **Lamers et al, (2012)**, a évalué l'effet du palmitate et de l'oléate dans des cellules musculaires lisses humaines (CMLh) et le rôle lipotoxique qu'ils pouvaient avoir dans la progression de l'athérosclérose. Ils ont observé que le palmitate augmentait l'IL-6 endogène et celle sécrétée dans le milieu extracellulaire comme dans notre modèle cellulaire de cardiomyocytes. Toutefois, chez Lamers et al, il y a eu préalablement une induction de l'activation d'NFκB en amont jouant ainsi un rôle inflammatoire important dans la dysfonction vasculaire. Or, on n'a pas mesurer le taux d'NFκB dans nos expériences. Cependant, après un

traitement des CMLh avec 100 μ M d'oléate pendant 18h, ils ont observé une activation du facteur NF κ B, ainsi qu'un ensemble de facteurs liés à la voie NF κ B provoquant une importante prolifération des CMLh. Cette prolifération n'étant pas observée avec le traitement au palmitate, ces auteurs suggèrent que l'oléate pourrait lui aussi jouer un rôle conséquent dans la progression de la dysfonction vasculaire (**Lamers et al, 2012**). Le rôle de l'oléate est certainement différent d'un type cellulaire à un autre. Dans les cardiomyocytes, par exemple, l'oléate semble atténuer la lipotoxicité engendrée par le palmitate, lui procurant dans ce cas un rôle lipoprotecteur, cytoprotecteur et cardioprotecteur. Tandis que, dans notre résultat présent dans la figure 11, l'oléate engendrait une toxicité sur la lignée H9C2 (Résultat qui sera discuté ici-bas). D'autre part, **Bulmus et al, (2013)** rapportait que l'administration d'une importante dose d'acide oléique chez des rats permettait d'induire le syndrome de détresse respiratoire aiguë servant de modèle animal pour cette pathologie humaine.

Nous avons également observé que l'IL6 permettrait de diminuer la mortalité cellulaire dans la lignée cellulaire H9C2 de rats en atténuant probablement la lipotoxicité, ce qui entraînerait une augmentation de la viabilité cellulaires. Bien que ces résultats soient intéressants, il faudrait refaire les expériences afin d'en tester la reproductibilité. On savait déjà par les travaux antérieurs de notre laboratoire, que l'oléate à lui seul n'était pas toxique pour les cardiomyocytes, et n'entraînait pratiquement pas de mortalité cellulaire (Tel démontré dans l'annexe 4, figure B). Or, la figure 11 montre que l'oléate est toxique provoquant une mortalité dans la lignée cellulaire H9C2 à la concentration de 300 μ M. L'ajout à l'oléate d'une concentration d'IL-6 recombinante de 0.1ng/ml et 0.3ng/ml semble diminuer la mortalité cellulaire. Ainsi, l'IL-6 semblerait avoir un effet cardioprotecteur et lipoprotecteur dans la lignée H9C2 suggérant que l'IL-6 pourrait avoir un rôle important dans le métabolisme lipidique. Cette concentration d'IL-6 est importante à connaître afin de déterminer quel niveau est nécessaire pour obtenir l'effet bénéfique de cette cytokine pro-inflammatoire dans les cardiomyocytes. Un effet et une concentration qui vont forcément être différents d'un type cellulaire à un autre, tel est le cas par exemple de celui cité préalablement par **Lamers et al, (2012)** où l'on observait une prolifération des CMLh suite au traitement à l'oléate, montrant ainsi son potentiel rôle lipotoxique. Toute fois, ce résultat appuie le résultat préliminaire de notre laboratoire ayant amorcé ces travaux, qui montrait que suite à

l'extinction du gène de l'IL-6 dans les cardiomyocytes, l'oléate devient lipotoxique engendrant la mort cellulaire. Ainsi, l'IL-6 serait forcément nécessaire au fonctionnement physiologique des cardiomyocytes assurant leurs viabilité. Dans notre cas cette concentration serait entre 0,1 et 0,3ng/ml, un niveau moins élevé que la concentration de l'IL-6 sécrétée par les cardiomyocytes après un traitement au palmitate. L'effet cytoprotecteur de l'oléate fut également observé par **Ricchi et al, (2009)** ils ont observé le rôle hépatoprotecteur de cet acide gras mono-insaturé. Ainsi, lorsqu'ils traitaient les hépatocytes avec du palmitate combiné à de l'oléate, ils observaient une diminution de l'apoptose ainsi qu'une diminution de la résistance à l'insuline

Enfin, nous avons observé une diminution du taux des TAG dans la lignée cellulaire H9C2 après un traitement à l'oléate combiné avec de l'IL-6 recombinante par rapport à un traitement à l'oléate seul. Cette expérience suggère une diminution du taux de lipides intracellulaires et une augmentation du catabolisme lipidique. Ainsi, ces travaux supporterait la possibilité que l'IL-6 pourrait protéger les cardiomyocytes contre la lipotoxicité en permettant l'augmentation de la β -oxydation des acides gras entraînant leurs dégradation dans la matrice mitochondriale, diminuant ainsi leurs accumulation intracellulaire. Dans l'article de notre laboratoire d'**Haffar et al, (2015)** il a été montré que le traitement des cardiomyocytes au palmitate activait des gènes cibles des PPARs, dont AcadI, AcsI et Cpt1b, pendant les premières heures de traitement soit entre 4h et 8h. Cependant, au bout de 24h de traitement, l'expression de ces gènes diminuait. Toutefois, lorsque les cardiomyocytes étaient traités à l'oléate AcadI, AcsI et Cpt1b augmentaient à tous les temps. D'autres travaux d'**Haffar et al, (2015B)** vont dans le sens de notre figure 12, où ils montrait que lorsque on traite des cardiomyocytes avec l'etomoxir permettant d'inhiber la Cpt1 qui est l'enzyme qui permet l'entrée les acides gras au niveau de la mitochondrie et permet d'amorcer leurs processus de β -oxydation et d'aboutir à la formation de l'ATP. On observait une diminution de la β -oxydation qui s'accompagnait d'une augmentation de mortalité cellulaire de façon significative, ceci étant illustré dans l'annexe 4. Ce même article (**Haffar et al, 2015**) illustre de manière intéressante l'importance de la β -oxydation dans le métabolisme lipidique au niveau des cardiomyocytes où l'on observait beaucoup moins de production de CO_2 , un produit métabolique issu du catabolisme de l'acétyl-CoA au niveau du cycle de Krebs suite au traitement au palmitate. Avec le traitement à l'oléate le taux de CO_2 produit était augmenté de manière très

importante, ce qui semblerait avoir un effet cytoprotecteur dans les cardiomyocytes. D'autres résultats montrent qu'après une diminution de la β -oxydation, cela est suivi d'une importante diminution de la Cpt1b (**Haffar et al, 2015**). Cependant, dans ce travail les expériences avec l'IL-6 recombinante n'ont pas été réalisées pour savoir si on n'arrivait à une augmentation au niveau du taux de Cpt1b.

L'article **d'Haffar et al, (2015)** montrait l'importance de Cpt1b dans le métabolisme lipidique. Il est possible que l'IL-6 puisse aussi permettre la diminution de l'accumulation des acides gras en limitant leur absorption dans les cardiomyocytes. Dans les travaux de **Sorrentino et al, (1988)** l'entrée de l'oléate au sein des cardiomyocytes semblait être saturée au bout d'un certain seuil grâce à une protéine cardiaque de liaison aux acides gras appelée FABP que l'on retrouve illustrée dans la figure 4.

Ainsi, on pourrait suggérer que l'IL-6 permettrait d'atteindre un probable plateau d'acides gras intracellulaire qui serait essentiel pour les fonctions physiologiques des cardiomyocytes. Un taux qui serait suffisamment lipoprotecteur et cardioprotecteur.

L'ensemble des résultats de mon travail de maîtrise doit être revalidé afin de pouvoir réaliser des tests statistiques et conclure à des résultats significatifs. En effet, l'ensemble des résultats ne sont pas significatifs par manque de reproduction des expériences. Plusieurs tentatives furent établies mais sans succès avec beaucoup de variabilité. Il est donc important de noter que l'ensemble des travaux au niveau de ce manuscrit ne doivent pas être pris pour acquis. Ils devraient plutôt être considérés comme étant un travail préliminaire qui pourrait aider à l'avenir à l'élaboration d'autres travaux qui s'en inspireraient pour des recherches futures.

VI. CONCLUSION:

Ce projet de maîtrise à vu le jour suite aux travaux préliminaires de notre laboratoire montrant que lorsque l'on réalisait l'extinction du gène de l'IL-6 dans les cardiomyocytes primaires, combiné à un traitement l'oléate non-toxique, on avait une importante augmentation de la mortalité cellulaire.

Cela nous avait amené à suggérer que l'IL-6 endogène était importante pour assurer la viabilité des cardiomyocytes. Selon nos travaux, cette cytokine aurait un effet cytoprotecteur cardiaque. Cependant, lorsque le taux d'IL-6 était trop élevé, celle-ci devenait létale pour les cardiomyocytes.

Parmi les rôles cardioprotecteurs que l'on a pu suggérer avec nos résultats très préliminaires dans ce manuscrit, l'IL-6 jouerait un rôle dans la régulation du métabolisme lipidique cardiaque en permettant une diminution des lipides intracellulaire et une augmentation du catabolisme lipidique. De cette manière, l'IL-6 endogène physiologique permettrait de protéger les cardiomyocytes contre la lipotoxicité des acides gras. Cette protection pourrait être liée à une augmentation de la β -oxydation qui permettrait la dégradation des acides gras par les cardiomyocytes, mais cette hypothèse reste à vérifier.

Il reste beaucoup de travail à faire afin de pouvoir s'assurer de la pertinence des résultats afin d'arriver à des conclusions significatives sur le rôle que pourrait jouer l'IL-6 dans le métabolisme lipidique de la cardiomyopathie diabétique.

BIBLIOGRAPHIE

Nouf M **Al-rasheed**, nawal M Al-rasheed, iman h hasa, Maha a Al-amin, hanaa n Al-ajmi, ayman M Mahmoud. sitagliptin attenuates cardiomyopathy by modulating the JaK/sTaT signaling pathway in experimental diabetic rats. Drug Design, Development and Therapy 10 (2016) 2095–2107.

Y. **Aso**, K. Okumura, N. Yoshida, K. Tayama, T. Kanda, I. Kobayashi, Y. Takemura and T. Inukai. Plasma interleukin-6 is associated with coagulation in poorly controlled patients with Type 2 diabetes. Diabet. Med. 20, 930–934 (2003).

Pavan K. **Battiprolu**, Thomas G. Gillette, Zhao V. Wang, Sergio Lavandero and Joseph A. Hill. Diabetic Cardiomyopathy: Mechanisms and Therapeutic Targets. Drug Discov Today Dis Mech. (2010); 7(2) 135–143. [doi:10.1016/j.ddmec.2010.08.001](https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2010.08.001).

Funda Gülcü **Bulmuş**, Mehmet Ferit Gürsu, Mehmet Hamdi Muz, İhsan Yaman, Özgür Bulmuş, Fatih Sakin. Protective Effects of Alpha-Lipoic Acid on Oleic Acid-Induced Acute Lung Injury in Rats. Balkan Med J (2013); 30: 309-14. DOI: [10.5152/balkanmedj.2013.8426](https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2013.8426).

Andrei B. **Borisov**, Alexei V. Ushakov, Aleksandr K. Zagorulko, Nikolai Y. Novikov, Ksenia F. Selivanova, Chris A. Edwards, Mark W. Russell. Intracardiac lipid accumulation, lipotrophy of muscle cells and expansion of myocardial infarction in type 2 diabetic patients. Micron 39 (2008) 944–95.

Manoja K. **Brahma**, Mark E. Pepin, Adam R. Wende. My Sweetheart Is Broken: Role of Glucose in Diabetic Cardiomyopathy. Diabetes Metab J (2017);41:1-9 <https://doi.org/10.4093/dmj.2017.41.1>.

Sheng-Huang **Chang**, Chung-Jung Liu, Chia-Hua Kuo, Hong Chen, Wen-Yuan Lin, Kun-Yu Teng, Sheng-Wei Chang, Chang-Hai Tsai, Fuu-Jen Tsai, Chih-Yang Huang, Bor-Show Tzang, and Wei-Wen Kuo. Garlic Oil Alleviates MAPKs- and IL-6-mediated Diabetes-related Cardiac Hypertrophy in STZ-induced DM Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume (2011), Article ID 950150, 11 pages. [doi:10.1093/ecam/neq075](https://doi.org/10.1093/ecam/neq075).

Keren **Cohen**, Maayan Waldman, Nader G. Abraham, Michal Laniado Schwartzman, Danny Gurfield, Dan Aravot, Michael Arad, Edith Hochhauser. Caloric restriction ameliorates cardiomyopathy in animal model of diabetes. Experimental Cell Research 350 (2017) 147–153.

J **Compston**. Type 2 diabetes mellitus and bone. J Intern Med (2017). doi.org/10.1111/joim.12725.

Chandler M, Cunningham S, Lund EM, Khanna C, Naramore R, Patel A, Day MJ. Obesity and Associated Comorbidities in People and Companion Animals: A One Health Perspective. J Comp Pathol. (2017) Apr 28. pii: S0021-9975(17)30122-6. [doi: 10.1016/j.jcpa.2017.03.006](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.03.006).

Kristin Cher-Rin **Chong**, Kieran Clarke, and Eylem Levelt. Metabolic remodelling in diabetic cardiomyopathy. Cardiovascular Research (2017) 113, 422–430.[doi:10.1093/cvr/cvx018](https://doi.org/10.1093/cvr/cvx018).

Jennifer G. **Duncan** et Brian N. **Finck**. The PPAR α -PGC-1 α Axis Controls Cardiac Energy Metabolism in Healthy and Diseased Myocardium. PPAR Research. Volume (2008), Article ID 253817, 10 pages [doi:10.1155/2008/253817](https://doi.org/10.1155/2008/253817).

Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. J Clin Invest. (1999) Jan; 103(2): 253-9.

Meric Erikci **Ertunc** et Gökhan S. **Hotamisligil**. Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. J. Lipid Res. (2016). 57: 2099–2114. DOI 10.1194/jlr.R066514.

Feldman EL, Nave KA, Jensen TS, Bennett DL. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. Neuron. (2017) Mar 22;93(6):1296-1313. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.005.

Fontes JA, Rose NR, Čiháková D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. Cytokine. (2015) Jul; 74(1): 62-8. doi: 10.1016/j.cyto.2014.12.024. Epub 2015 Jan 31.

Gandhipuram Periyasamy **Senthilkumar**, Melepallappil Sabeenakumari Anithalekshmi, Md. Yasir, Sreejith Parameswaran, Rajaa muthu Packirisamy, Zachariah Bobby. Role of omentin 1 and IL-6 in type 2 diabetes mellitus patients with diabetic nephropathy. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews 12 (2018) 23–26.

Haffar T, Bérubé-Simard FA, Bousette N. Cardiomyocyte lipotoxicity is mediated by IL-6 and causes down-regulation of PPARs. Biochem Biophys Res Commun. (2015) Mar 27; 459(1): 54-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.062. Epub 2015 Feb 21.

Haffar T, Bérubé-Simard FA, Bousette N. Impaired fatty acid oxidation as a cause for lipotoxicity in cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun. (2015 B) Dec 4-11;468(1-2): 73-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.162. Epub 2015 Nov 4.

Anne D. **Hafstad**, Neoma Boardman , Ellen Aasum. How Exercise May Amend Metabolic Disturbances in Diabetic Cardiomyopathy. ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING. Volume 22, Number 17, (2015). DOI: 10.1089/ars.2015.6304

Khalil **Hajiasgharzadeh**, Javad Mirnajafi-Zadeh, Ali R. Mani. Interleukin-6 impairs chronotropic responsiveness to cholinergic stimulation and decreases heart rate variability in mice. European Journal of Pharmacology 673 (2011) 70–77.

A. **Kitamura**, G. Hasegawa, H. Obayashi, K. Kamiuchi, M. Ishii, M. Yano, T. Tanaka, M. Yamaguchi, H. Shigeta, M. Ogata, N. Nakamura and T. Yoshikawa. Interleukin-6 polymorphism (–634C/G) in the promotor region and the progression of diabetic nephropathy in Type 2 diabetes . *Diabet. Med.* 19, 1000–1005 (2002).

Alexander **Krogmann**, Katrin Staiger, Carina Haas, Nadja Gommer, Andreas Peter, Martin Heni, Fausto Machicao, Hans-Ulrich Häring, Harald Staiger . Inflammatory response of human coronary artery endothelial cells to saturated long-chain fatty acids. *Microvascular Research* 81 (2011) 52–59 .

Mirian A. **Kurauti**, José M. Costa-Júnior, Sandra M. Ferreira, Gustavo J. Santos, Carlos H. G. Sponton, Everardo M. Carneiro, Guilherme D. Telles, Mara P. T. Chacon-Mikahil, Cláudia R. Cavaglieri, Luiz F. Rezende & Antonio C. Boschero. Interleukin-6 increases the expression and activity of insulin- degrading enzyme. *Sci. Rep.* 7, 46750; doi: 10.1038/srep46750 (2017).

Markku **Laakso** et Johanna **Kuusisto**. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nature Reviews Endocrinology* 10 (2014) 293-302. [doi:10.1038/nrendo.2014.29](https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.29).

Daniela **Lamers**, Raphaela Schlich, Angelika Horrigths, Andrea Cramer, Henrike Sell, Juergen Eckel. Differential impact of oleate, palmitate, and adipokines on expression of NF-kB target genes in human vascular smooth muscle cell. *Molecular and Cellular Endocrinology* 362 (2012) 194–201.

Ting-I **Lee**, Yu-Hsun Kao, Wen-Chin Tsai, Cheng-Chih Chung, Yao-Chang Chen, and Yi-Jen Chen. HDAC Inhibition Modulates Cardiac PPARs and Fatty Acid Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy. *PPAR Research Volume* (2016), Article ID 5938740, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5938740>.

Ting-Wei **Lee**, Kuan-Jen Bai, Ting-I Lee, Tze-Fan Chao, Yu-Hsun Kao and Yi-Jen Chen. PPARs modulate cardiac metabolism and mitochondrial function in diabetes. *Journal of Biomedical Science* (2017) 24:5. [DOI 10.1186/s12929-016-0309-5](https://doi.org/10.1186/s12929-016-0309-5).

Jonghae Lee, Sewon Lee, Hanrui Zhang, Michael A. Hill, Cuihua Zhang, Yoonjung Park. Interaction of IL-6 and TNF- α contributes to endothelial dysfunction in type 2 diabetic mouse hearts. *PLoS ONE* 12 (2011): e0187189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187189>.

Hai-han **Liao**, Jin-xiu Zhu, Hong Feng, Jian Ni, Nan Zhang, Si Chen, Huang-jun Liu, Zheng Yang, Wei Deng and Qi-Zhu Tang. Myricetin Possesses Potential Protective Effects on Diabetic Cardiomyopathy through Inhibiting I κ B α /NF κ B and Enhancing Nrf2/HO-1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume (2017), Article ID 8370593, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/8370593>.

Quan **Liu**, Shudong Wang, Lu Cai. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage. *J Diabetes Invest* 5 (2014) 623–634. doi: [10.1111/jdi.12250](https://doi.org/10.1111/jdi.12250).

Qin-kang **Lu**, Jun-tao Zhang, Na Zhao, Hui-yun Wang, Qi-hu Tong, Shou-li Wang. Association of IL-6 Gene (–174 and –572 G/C) Polymorphisms with Proliferative Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in a Chinese Population. *Ophthalmic Res* (2017);58:162–167. DOI: [10.1159/000475670](https://doi.org/10.1159/000475670).

Lynch SK et Abràmoff MD. Diabetic retinopathy is a neurodegenerative disorder. *Vision Res*. (2017) Apr 27. pii: S0042-6989(17)30048-2. doi: [10.1016/j.visres.2017.03.003](https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.03.003).

Maja **Malenica**, Mira Šilar, Tanja Dujić, Tamer Bego, Sabina Semiz, Selma Škrbo, Besim Prnjavorac, Adlija Čaušević. Importance of inflammatory markers and IL-6 for diagnosis and follow up of patients with type 2 diabetes mellitus. *Med Glas (Zenica)* (2017); 14(2): 169-175.

Ardeshir **Moayeri**, Mahmoud Mohamadpour, Seyedeh Fatemeh Mousavi, ehsan Shirzadpour, Safoura Mohamadpour, Mansour Amraei .Fracture risk in patients with type 2 diabetes mellitus and possible risk factors: a systematic review and meta-analysis . Therapeutics and Clinical Risk Management 13 (2017) 455–468.

Mario Luca **Morieri**, Angelina Passaro, and Giovanni Zuliani. Interleukin-6 (Trans-Signaling) and Ischemic Vascular Disease: The Important Role of Soluble gp130. Hindawi. Mediators of Inflammation. Volume (2017), Article ID 1396398, 6 pages <https://doi.org/10.1155/2017/1396398>.

Andreas **Oberbach**, Nadine Schlichting, Marco Heinrich, Holger Till, Jens-Uwe Stolzenburg, Jochen Neuhaus. Fatty Acid Palmitate Impairs the Vitality and Function of Cultured Human Bladder Smooth Muscle Cells. PLoS ONE 7(7): e41026. [doi:10.1371/journal.pone.0041026](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041026). July (2012), Volume 7, Issue 7, e41026.

Xavier **Palomer**, Javier Pizarro-Delgado, Emma Barroso, and Manuel Vázquez-Carrera. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. Trends in Endocrinology & Metabolism.1272 No. of Pages 13 (2017). doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.009.

Peng CH, Yang YS, Chan KC, Kornelius E, Chiou JY, Huang CN2. Periodontal Treatment and the Risks of Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 Diabetes: A Retrospective Cohort Study. Intern Med. (2017); 56(9): 1015-1021. [doi: 10.2169/internalmedicine.56.7322](https://doi.org/10.2169/internalmedicine.56.7322). Epub 2017 May 1.

Rapport mondial sur le diabete, OMS, 2016. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254648/1/9789242565256-fre.pdf?ua=1> .

Raška I Jr, Rašková M, Zikán V, Škrha J. Prevalence and Risk Factors of Osteoporosis in Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes Mellitus. *Cent Eur J Public Health*. (2017) Mar; 25(1):3-10. [doi: 10.21101/cejph.a4717](https://doi.org/10.21101/cejph.a4717).

Matteo **Ricchi**, Maria Rosaria Odoardi, Lucia Carulli, Claudia Anzivino, Stefano Ballestri, Adriano Pinetti, Luca Isaia Fantoni, Fabio Marra, Marco Bertolotti, Sebastiano Banni, Amedeo Lonardo, Nicola Carulli and Paola Loria. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24 (2009) 24830–840.

Darren M. **Riddy**, Philippe Delerive, Roger J. Summers, Patrick M. Sexton, and Christopher J. Langmead. G Protein–Coupled Receptors Targeting Insulin Resistance, Obesity, and Type 2 Diabetes Mellitus. *Pharmacol Rev* 70:39–67, January 2018. doi.org/10.1124/pr.117.014373.

Dongdong **Sun**, Min Shen, Jiayi Li, Weijie Li, Yingmei Zhang, Li Zhao, Zheng Zhang, Yuan Yuan, Haichang Wang, Feng Cao. Cardioprotective effects of tanshinone IIA pretreatment via kinin B2 receptor-Akt-GSK-3b dependent pathway in experimental diabetic cardiomyopathy. Sun et al. *Cardiovascular Diabetology* (2011), 10:4.

Sundararaghavan V, Mazur MM, Evans B, Liu J, Ebraheim NA. Diabetes and bone health: latest evidence and clinical implications. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. (2017) Mar;9(3):67-74. [doi: 10.1177/1759720X16687480](https://doi.org/10.1177/1759720X16687480). Epub 2017 Jan 24.

Dario **Sorrentino**, Decherd Stump, Barry J. Potter, Richard B. Robinson, Roy White, Chi-Li Kiang and Paul D. Berk. Oleate uptake by cardiac myocytes is carrier mediated and involves a 40-kD plasma membrane fatty acid binding protein similar to that in liver, adipose tissue, and gut. *J Clin Invest*. (1988) Sep; 82(3): 928-35.

Van Dieren S, Beulens JW, van der Schouw YT, Grobbee DE, Neal B. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* (2010) May;17 Suppl 1:S3-8. doi: 10.1097/01.hjr.0000368191.86614.5a.

WEN-KE **WANG**, QING-HUA LU, XIN WANG, BEN WANG, JUAN WANG, HUI-PING GONG, LIN WANG, HAO LI and YI-MENG DU. Ulinastatin attenuates diabetes-induced cardiac dysfunction by the inhibition of inflammation and apoptosis. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE* 14: 2497-2504, (2017).

David R. **Whiting**, Leonor Guariguata, Clara Weil, Jonathan Shaw. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 94 (2011) 311-321. doi:10.1016/j.diabres.2011.10.029.

Peter **Wolf**, Yvonne Winhofer, Martin Krššák and Michael Krebs. Heart, lipids and hormones. *Endocrine Connections* 6 (2017) 59–69.

Bin **Wu**, Jie Lin, Jian Luo, Dong Han, Miaomiao Fan, Tao Guo, Ling Tao, Ming Yuan and Fu Yi. Dihydromyricetin Protects against Diabetic Cardiomyopathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *BioMed Research International Volume* (2017), Article ID 3764370, 13 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/3764370>.

Yang **Zhang**, Jing-Hao Wang, Yi-Yuan Zhang, Ying-Zhe Wang, Jin Wang, Yue Zhao, Xue-Xin Jin, Gen-Long Xue, Peng-Hui Li, Yi-Lin Sun, Qi-He Huang, Xiao-Tong Song, Zhi-Ren Zhang, Xu Gao, Bao-Feng Yang, Zhi-Min Du & Zhen-Wei Pan. Deletion of interleukin-6 alleviated interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy of mice through affecting TGFβ1 and miR-29 pathways. *Sci. Rep.* 6, 23010; doi: 10.1038/srep23010 (2016).

Yan **Zheng**, Sylvia H. Ley et Frank B. Hu. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature ENDOCRINOLOGY* 2018. doi:10.1038/nrendo.2017.151.

ANNEXES

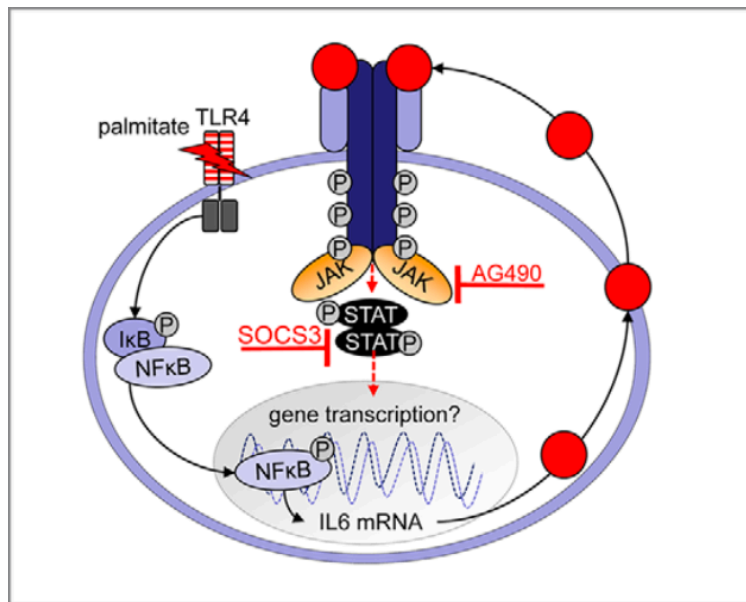
Table 2 – Prevalence of diabetes and estimated diabetes numbers among adults aged 20–79 years for the years 2011 and 2030: 80 most populous countries.

Country	Prevalence (%) adjusted to				Number of adults with diabetes (000s)		Mean annual increment (000s)
	World population		National population				
	2011	2030	2011	2030	2011	2030	
AFR							
Angola	2.9	3.4	2.2	2.4	185	383	10
Burkina Faso	3.0	3.6	2.4	2.7	175	371	10
Cameroon	6.1	7.1	5.2	5.9	501	913	22
Côte d'Ivoire	4.9	6.1	4.2	5.0	406	813	21
Democratic Republic of Congo	3.1	3.7	2.5	2.7	731	1422	36
Ethiopia	3.4	3.7	3.5	3.8	1377	2629	66
Ghana	5.0	6.2	4.1	5.0	517	1036	27
Kenya	5.1	6.3	4.0	5.0	769	1683	48
Madagascar	4.7	5.1	4.4	4.5	428	831	21
Malawi	5.6	6.5	5.4	6.1	352	747	21
Mali	1.9	2.4	1.5	1.8	100	217	6
Mozambique	3.1	3.9	2.7	3.2	295	581	15
Niger	4.2	4.3	4.4	4.7	284	620	18
Nigeria	4.8	6.0	4.0	4.8	3055	6113	161
South Africa	7.0	7.9	6.5	7.2	1947	2548	32
Uganda	2.8	3.5	2.2	2.5	308	690	20
United Republic of Tanzania	2.8	3.8	2.3	3.0	473	1107	33
EUR							
Azerbaijan	2.8	3.2	2.6	3.4	167	260	5
Belarus	8.0	9.3	9.3	11.2	677	745	4
Belgium	4.8	5.7	6.6	7.6	515	604	5
Czech Republic	5.3	6.4	6.9	8.3	557	660	5
France	5.4	6.6	7.3	8.2	3238	3888	34
Germany	5.3	6.5	8.0	9.5	5022	5585	30
Greece	5.1	6.1	7.0	8.3	603	714	6
Hungary	6.0	7.0	7.6	8.4	568	599	2
Italy	5.1	6.4	7.8	9.5	3560	4238	36
Kazakhstan	7.7	9.0	7.5	9.0	801	1128	17
Netherlands	5.2	6.4	7.3	8.8	882	1095	11
Poland	9.0	10.1	10.6	12.2	3057	3410	19

Table 2 (Continued)							
Country	Prevalence (%) adjusted to				Number of adults with diabetes (000s)		Mean annual increment (000s)
	World population		National population				
	2011	2030	2011	2030	2011	2030	
Portugal	9.5	11.5	12.7	15.2	1021	1201	9
Romania	7.7	9.0	9.2	11.1	1506	1709	11
Russian Federation	9.7	11.5	11.5	13.9	12,593	14,113	80
Serbia	7.7	9.0	9.3	10.5	671	752	4
Spain	6.3	7.8	8.1	10.6	2840	3932	57
Sweden	4.2	5.0	5.7	6.1	386	433	2
Turkey	7.9	9.4	7.4	9.5	3502	5921	127
Ukraine	2.9	3.3	3.5	4.0	1196	1208	1
United Kingdom	5.2	6.2	6.8	7.5	3064	3646	31
Uzbekistan	6.4	7.7	5.0	6.8	813	1547	39
MENA							
Afghanistan	7.6	8.6	6.0	6.2	818	1649	44
Algeria	6.9	7.7	6.3	7.6	1435	2351	48
Egypt	16.6	19.1	15.2	17.8	7323	12,374	266
Iraq	9.1	10.4	7.2	8.0	1089	2334	66
Islamic Republic of Iran	11.1	12.8	9.3	13.1	4695	8384	194
Morocco	6.8	7.9	6.4	7.8	1268	2035	40
Pakistan	7.9	8.9	6.7	7.8	6349	11,408	266
Saudi Arabia	19.6	22.3	16.2	20.8	2760	5462	142
Sudan	8.6	9.8	7.6	8.5	1667	3166	79
Syrian Arab Republic	9.9	11.5	8.2	9.4	890	1707	43
Tunisia	9.5	11.2	8.9	11.8	630	1042	22
Yemen	9.6	11.2	6.7	7.4	727	1569	44
NAC							
Canada	8.4	10.0	10.8	12.8	2716	3672	50
Mexico	15.6	17.6	14.8	17.6	10,294	16,440	323
United States of America	9.3	10.5	10.9	11.8	23,722	29,609	310
SACA							
Argentina	5.5	6.4	5.8	6.5	1532	2078	29
Brazil	10.1	11.9	9.7	12.3	12,440	19,605	377
Chile	9.5	11.1	10.2	12.3	1190	1730	28
Colombia	9.7	11.5	9.1	11.4	2609	4412	95
Cuba	9.4	11.4	11.4	15.3	939	1293	19
Ecuador	6.6	7.8	6.0	7.5	524	890	19
Guatemala	9.3	10.9	7.7	8.4	533	1037	27
Peru	6.0	6.8	5.4	6.4	942	1523	31
Venezuela	10.2	12.0	9.4	11.4	1675	2835	61
SEA							
Bangladesh	10.5	13.7	9.6	13.3	8406	16,837	444
India	9.0	10.6	8.3	9.9	61,258	101,203	2102
Nepal	3.6	5.4	3.0	4.5	488	1171	36
Sri Lanka	7.5	8.7	7.8	9.1	1080	1467	20
WP							
Australia	6.6	7.9	8.1	9.3	1292	1781	26
Cambodia	2.9	3.5	2.5	3.1	199	363	9
China	8.8	10.5	9.3	12.1	90,045	129,695	2087
Democratic People's Republic of Korea	8.4	9.7	9.1	10.3	1508	1934	22
Indonesia	5.1	5.9	4.7	5.9	7292	11,802	237
Japan	7.7	8.9	11.2	12.0	10,674	10,152	27
Malaysia	12.1	13.7	11.7	13.3	2030	3297	67
Myanmar	7.1	8.6	6.7	8.9	2104	3482	73
Philippines	9.7	11.4	8.2	9.6	4220	7430	169
Republic of Korea	7.5	8.7	8.8	11.1	3186	4251	56
Taiwan	8.3	8.6	9.6	11.1	1665	2010	18
Thailand	7.5	8.7	8.2	9.8	4014	5454	76
Viet Nam	3.2	3.9	2.9	4.2	1703	3116	74

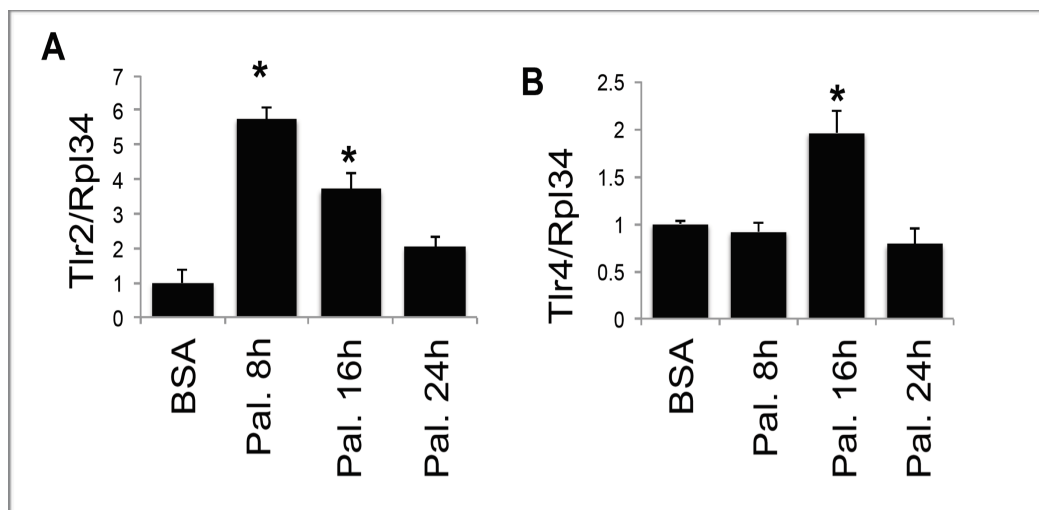
Annexe 1: La prévalence du diabète dans certains pays du monde ainsi que le nombre d'atteints pour les années 2011 et la projection pour 2030.

Un tableau étant tiré de l'article de Whiting et al, 2011 (Whiting et al, 2011).



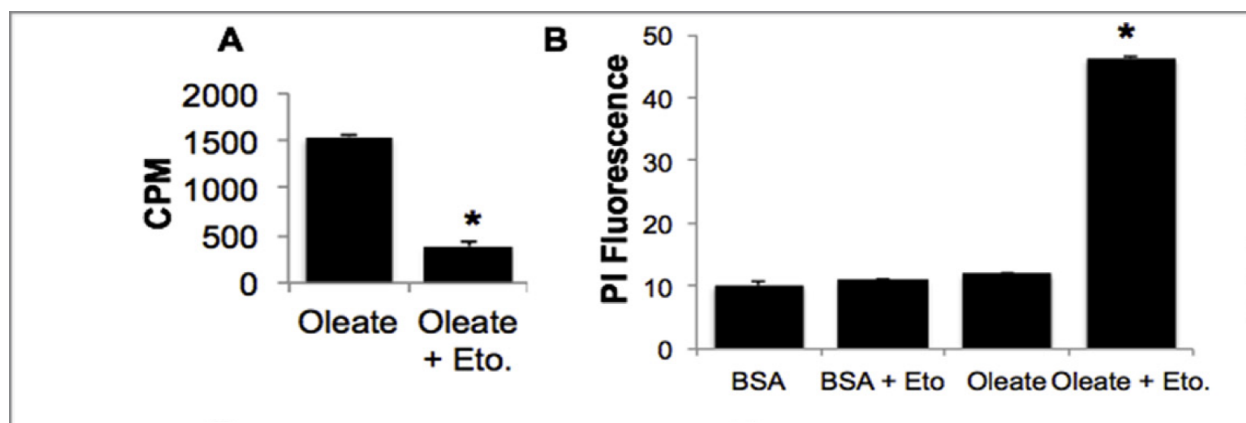
Annexe 2: La voie de signalisation JAK/STAT lors du signal autocrine de l'IL6 suite à un traitement au palmitate.

Figure publiée dans l'article d'Oberbach et al, 2015. En rouge en retrouve les inhibiteurs de JAK et STAT. (Oberbach et al, 2012).



Annexe 3: L'effet du palmitate sur l'expression de TLR2 et TLR4.

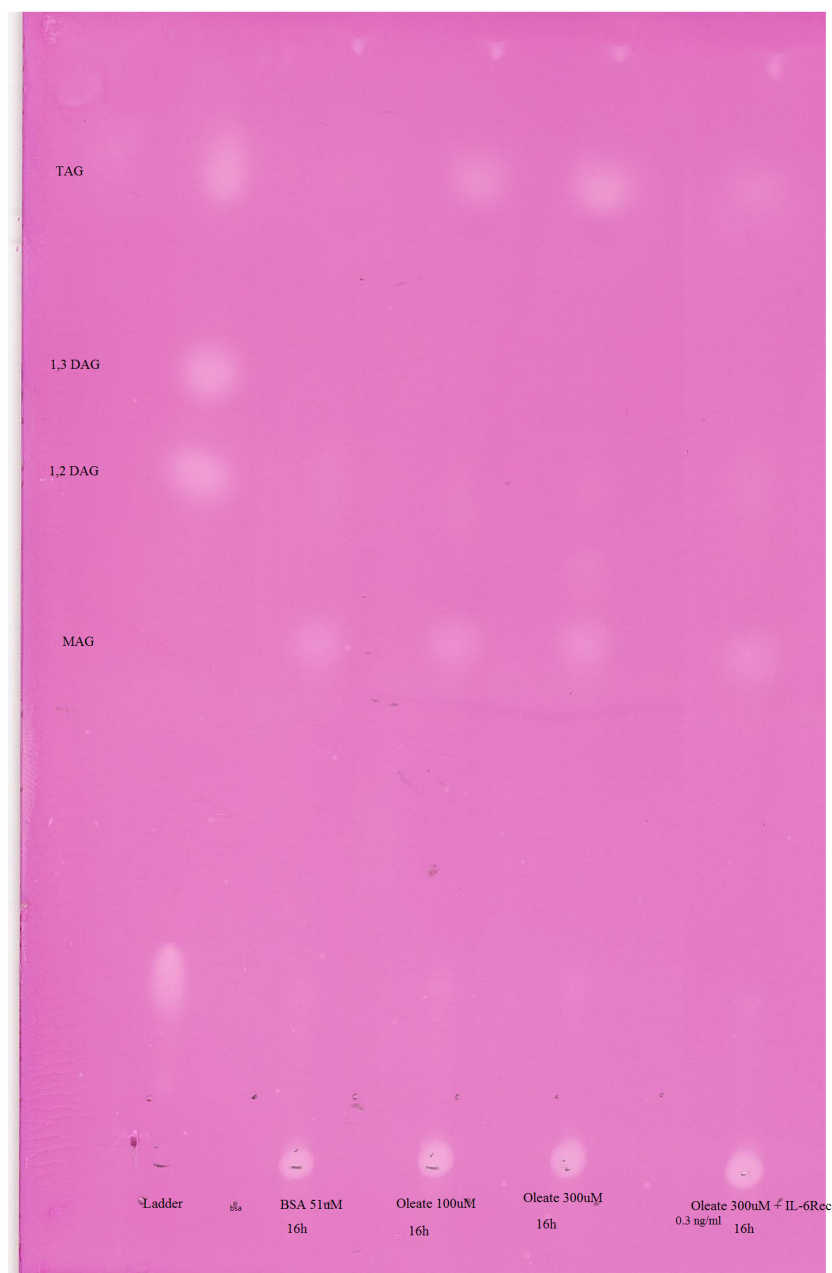
Figure montrant des résultats préliminaires obtenus au laboratoire avant la réalisation des travaux rapportés dans ce manuscrit (Laboratoire du Dr Nicolas Bousette, Institut de cardiologie de Montréal).



Annexe 4: L'effet de l'Etomoxir sur la β -oxydation et la viabilité des cardiomyocytes.

Figure de résultats publiée par notre laboratoire dans l'article d'Haffar et al, 2015 B (**Haffar et al, 2015B**).

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES



Résultat supplémentaire 1: Résultat de chromatographie sur couche mince obtenu sur plaque de silice, illustrant la figure 9 des résultats.

(Le ladder étant le marqueur de poids moléculaire comprenant le MAG: Monoacylglycérol, le 1,2 ou 1,3 DAG: Diacylglycérol et le TAG: Triacylglycérol)

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 31, 2018

This Agreement between université de Montréal -- ourdia yahi ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	4279420727543
License date	Jan 31, 2018
Licensed Content Publisher	Oxford University Press
Licensed Content Publication	Cardiovascular Research
Licensed Content Title	Metabolic remodelling in diabetic cardiomyopathy
Licensed Content Author	Chong, Cher-Rin; Clarke, Kieran
Licensed Content Date	Feb 8, 2017
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	L'étude du rôle de l'interleukine 6 dans le métabolisme lipidique de la cardiomyopathie diabétique
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Apr 2018
Permissions cost	0.00 CAD
Value added tax	0.00 CAD
Total	0.00 CAD
Requestor Location	université de Montréal 6644 place beaubien
	MONTREAL, QC H1M 3V8 Canada Attn: ourdia yahi
Publisher Tax ID	GB125506730
Billing Type	Invoice
Billing Address	université de Montréal
	MONTREAL, QC Canada Attn: ourdia yahi
Total	0.00 CAD
Terms and Conditions	

STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.

5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
 6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com
 7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
 8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
 9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.
 10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
 11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
 12. Other Terms and Conditions:
- v1.4

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 16, 2018

This Agreement between universit  de Montréal -- ourdia yahi ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4270931092762
License date	Jan 16, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Cytokine
Licensed Content Title	The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure
Licensed Content Author	Jillian A. Fontes,Noel R. Rose,Daniela �ih�kov�
Licensed Content Date	Jul 1, 2015
Licensed Content Volume	74
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	7
Start Page	62
End Page	68
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis/dissertation	L�tude du rôle de l'interleukine 6 dans le métabolisme lipidique de la cardiomyopathie diabétique
Expected completion date	Apr 2018
Estimated size (number of pages)	50
Requestor Location	universit� de Montréal
	MONTREAL, QC Canada Attn: ourdia yahi
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. Translation: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. Posting licensed content on any Website: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears

or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.9

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.